



**Luísa Isabel Serra da Glória Fialho**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

## **Produção e avaliação de efeitos citotóxicos de nanopartículas de prata incorporadas em fibras obtidas por electrofiação simples e coaxial**

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Reis Henriques, Professor Auxiliar, FCT-UNL  
Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar, FCT-UNL  
Arguente: Prof. Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista, Professor Associado, FCT-UNL  
Orientadora: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2015**

---

**Luísa Isabel Serra da Glória Fialho**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Produção e avaliação de efeitos citotóxicos de nanopartículas de prata incorporadas em fibras obtidas por electrofiação simples e coaxial**

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Reis Henriques, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Arguente: Prof. Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista, Professor Associado, FCT-UNL

Orientadora: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL

**Março 2015**



**Produção e avaliação de efeitos citotóxicos de nanopartículas de prata incorporadas em fibras obtidas por electrofiação simples e coaxial**

Copyright© 2015- Todos os direitos reservados- Luísa Isabel Serra da Glória Fialho, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

”A Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.



”Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso,  
de impenetrável e inexpugnavelmente nosso.”  
Livro do desassossego, Fernando Pessoa.

*Para a minha Ia.*





# Agradecimentos

A todos aqueles que contribuíram de forma diversa para a realização do presente trabalho, apresento os meus mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Professora Célia Henriques, do grupo GREAT, por todo o empenho, dedicação, ajuda e pelo conhecimento transmitido durante todo o trabalho. Obrigado por todo o tempo dispensado por se reunir comigo todas as semanas destes 6 meses e pelo seu sentido crítico.

Ao meu co-orientador, Professor Jorge Silva, do grupo GREAT, por toda a ajuda, disponibilidade e pelos conselhos imprescindíveis.

Ao Professor José Luís Ferreira, do grupo GREAT, pela colaboração e conselhos.

À minha (única) GREAT colega, Tânia Vieira, por toda a boa disposição, pelo excelente ambiente de trabalho criado e por uma nova amizade. Assim como também quero agradecer às minhas outras "colegas" pelos momentos de descontração nas horas de pausa que revitalizavam a alma.

Aos meus amigos de sempre, Marta Guerreiro e Bruno Colaço (um obrigado particular pela ajuda no AutoCAD e Photoshop, e pelo tempo que perdeste comigo), obrigada pela eterna e velha amizade e por me fazerem sempre sentir em casa mesmo estando longe.

Às minhas queridas amigas, Raquel Delgado, Cátia Coelho, Tânia Franco, Soraia Rosário e Ana Raquel Brás, por todo o amor, amizade, compreensão e loucura, por sermos à prova do tempo e distância, porque só com vocês é que a santa terrinha volta a ter o seu velho encanto.

Aos grandes amigos que ganhei ao longo destes anos, Ana Sousa, Joana Costa, Alexandre Medina, Rui Pinto, João Tavares, Edgar Mascarenhas, Inês Ropio, Andreia Serrano e Bruno Ribeiro. Obrigada pelos serões de estudo, pelos serões de festa, de conversa infinita, pelas boas férias algarvias, e por terem tornado estes 5 anos de luta inesquecíveis!

À minha *bella famiglia Pisana*, Ana Sousa (outra vez), Carolina Fiel, João Rocha e Nuno Teixeira, o melhor e único *regalo* que poderia ter trazido do nosso memorável *Erasmus*. Obrigada por continuarmos tão, ou mais, unidos ao fim destes anos pós-Pisa.

À minha família, aos meus avós, tios (Manuel e Ricardina Mira), primos (Pedro e Juju Mira, e Luís Maria) e irmã (Susana Fialho), e à minha família "emprestada", à minha Ia, Pinto, Orlando, Bráulio e Mariana, pelo amor, apoio incondicional e por terem sempre acreditado em mim.

Finalmente, um obrigado àqueles que me proporcionaram tudo isto e a quem tudo devo, aos meus Pais. Obrigada por me terem deixado "cair" e por me ajudarem sempre a "levantar". Obrigada por acreditarem e por se orgulharem de mim. Obrigada por todo o Amor e sacrifício. Obrigada Mãe, por toda a paciência de me ouvires, mas, especialmente, por nunca me teres deixado desistir!

Obrigada a todos!



# Resumo

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm-se tornado alvo de estudo devido ao reconhecimento da sua eficiente acção microbiana associada a uma menor toxicidade quando comparada com a da prata metálica. Assim, a sua incorporação em substitutos de pele para utilização em feridas tem ganho interesse como agente capaz de prevenir infecções. Nestas aplicações, a utilização de matrizes de nanofibras constitui um suporte conveniente para a regeneração de tecidos.

Neste trabalho, foram produzidas, a partir de nitrato de prata, AgNPs em soluções de dimetilformamida (agente redutor) e polivinilpirrolidona (PVP, agente estabilizador). A irradiação das soluções com luz UV foi usada para promover a sua formação. Este processo foi controlado por espectrofotometria de UV-vis por análise do pico associado à ressonância plasmónica característica das AgNPs, localizado pelos 400 nm. Imagens de TEM revelaram que a partir de uma solução de PVP a 15% com uma proporção mássica de PVP: AgNO<sub>3</sub> de 100:1 obtêm-se AgNPs esféricas com diâmetros de 13 nm. As AgNPs foram incorporadas em nanofibras poliméricas de PVP e policaprolactona (PCL), produzidas quer por electrofiação simples (ES) de uma mistura de soluções dos dois polímeros quer por electrofiação coaxial (EC). Na EC, a solução de PVP foi utilizada como *core* e a de PCL como envolvente. Os processos foram ajustados por forma a electrofiar as soluções e depositar fibras com a mesma razão mássica Ag:Polímero. As nanofibras obtidas por ES mostraram ser mais uniformes do que as de EC- imagens de TEM revelaram que nem todas elas apresentavam uma estrutura coaxial. As AgNPs libertadas das fibras para água foram analisadas por espectroscopia de UV-vis em função do tempo de imersão. As fibras coaxiais revelaram uma libertação mais rápida e intensa. Nos testes de citotoxicidade, verificou-se que a quantidade de prata nas fibras necessária para apresentar efeitos citotóxicos é maior do que na utilização directa do AgNO<sub>3</sub>. Porém, ao contrário do registado no sal, o tempo de exposição ao meio condicionado pelas fibras aumenta o seu potencial citotóxico.

Palavras chave: nanopartículas de prata, nanofibras, electrofiação, electrofiação coaxial, espectrofotometria de UV-vis, citotoxicidade.



# Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have been studied due to their efficient antimicrobial activity associated to a lower toxicity when compared to metallic silver. Therefore, their incorporation into skin substitutes for use in wounds with capacity of protection against infections have gained interest. So, for this kind of application, electrospun mats are adequate scaffolds for tissue regeneration. In this work, AgNPs, from silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) were produced in solution with dimethylformamide (reducing agent) and polyvinylpyrrolidone (PVP, capping agent). The solutions were irradiated with 254 nm UV light promoting AgNPs formation. This process was controlled by UV-vis spectrophotometry studying the plasmon resonance peak characteristic for AgNPs at around 400 nm, and it was selected an irradiation time of 4h. From a solution with 15% of PVP and a mass ratio PVP:  $\text{AgNO}_3$ =100:1, TEM images reveled that AgNPs had spherical shape with diameters around 13 nm. Polymeric fibers with AgNPs incorporated were produced by electrospinning (ES) of a mixture of PVP and polycaprolactone (PCL) solutions, and by coaxial electrospinning (CE). In CE, PVP solution was used as core and PCL as a sheath fluid. Both processes were adapted in order to electrospun the solutions and to produce fibers with the same mass ratio Ag: polymer. Nanofibers produced by ES were more uniforms. TEM images showed that not all coaxial fibers had a core-sheath structure. AgNPs released from the matrices to water were analyzed by UV-vis spectroscopy according to the immersion time. AgNPs' release was faster and more intense in the case of coaxial nanofibers. Cytotoxicity tests revealed that the quantity values of silver required to produce cytotoxic effects were bigger for fibers than for the direct application of  $\text{AgNO}_3$ . However, unlike recorded with the salt, the exposition time to conditioned medium by fibers increased their cytotoxic potential.

Keywords: Silver nanoparticles, nanofibers, electrospinning, coaxial electrospinning, UV-vis spectrophotometry, citotoxicity.



# Conteúdo

<b>Resumo</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>xix</b>
<b>Lista de símbolos</b>	<b>xxi</b>
<b>Lista de siglas e abreviaturas</b>	<b>xxiii</b>
<b>1 Enquadramento Teórico</b>	<b>1</b>
1.1 Introdução . . . . .	1
1.1.1 Espectrofotometria de UV-vis . . . . .	1
1.2 Acção celular da Prata . . . . .	2
1.2.1 Acção Microbiológica da Prata . . . . .	2
1.2.2 Toxicidade da Prata . . . . .	4
1.2.3 Métodos <i>in vitro</i> de avaliação da actividade antimicrobiana e citotoxicidade . .	5
1.3 Produção de nanopartículas de prata e de fibras coaxiais . . . . .	7
1.3.1 Produção de Nanopartículas de Prata . . . . .	7
1.3.2 Produção de nanofibras . . . . .	11
1.3.3 Técnica de Electrofiação . . . . .	11
1.3.4 Técnica de Electrofiação Coaxial . . . . .	15
<b>2 Materiais e Métodos</b>	<b>21</b>
2.1 Materiais . . . . .	21
2.1.1 Síntese das nanopartículas de prata . . . . .	21
2.1.2 Produção das matrizes de nanofibras . . . . .	21

2.1.3	Cultura celular . . . . .	21
2.2	Métodos . . . . .	22
2.2.1	Síntese de nanopartículas de prata . . . . .	22
2.2.2	Produção das matrizes de nanofibras . . . . .	22
2.2.3	Propriedades das soluções . . . . .	27
2.2.4	Espectrofotometria de UV-vis . . . . .	28
2.2.5	Avaliação da libertação de nanopartículas de prata a partir de matrizes . . . . .	28
2.2.6	Avaliação microscópica . . . . .	29
2.3	Teste de citotoxicidade . . . . .	31
<b>3</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>33</b>
3.1	Síntese e caracterização de nanopartículas de prata . . . . .	33
3.2	Produção das fibras . . . . .	39
3.2.1	Electrofiação Simples . . . . .	39
3.2.2	Electrofiação Coaxial . . . . .	41
3.3	Ensaio de libertação de nanopartículas de prata a partir de matrizes . . . . .	47
3.3.1	Libertação a partir de matrizes de nanofibras simples . . . . .	47
3.3.2	Libertação a partir de matrizes de nanofibras coaxiais . . . . .	47
3.4	Teste de citotoxicidade . . . . .	49
3.4.1	Ensaio I . . . . .	49
3.4.2	Ensaio II . . . . .	50
3.4.3	Ensaio III e IV . . . . .	51
3.4.4	Ensaio com $\text{AgNO}_3$ . . . . .	54
<b>4</b>	<b>Conclusões e perspectivas futuras</b>	<b>55</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>57</b>
<b>A</b>	<b>Teste de Citotoxicidade</b>	<b>63</b>
A.1	Cultura celular . . . . .	63
A.1.1	Contagem de células . . . . .	63
A.2	Teste de extracto por método indirecto (Teste de citotoxicidade) . . . . .	64
A.3	Teste de citotoxicidade do $\text{AgNO}_3$ . . . . .	65



# Lista de Figuras

1.1	Espectro de UV-vis das AgNPs libertadas a partir de nanofibras. . . . .	2
1.2	Imagens TEM de amostras de bactérias <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	4
1.3	Os três meios de exposição do corpo humano a compostos de prata. . . . .	5
1.4	Gráfico da percentagem de redução em função do tempo (minutos) de colónias de <i>E. coli</i> . . . . .	6
1.5	Imagens da zona de inibição de nanofibras de prata/polímero pela técnica de Kirby-Bauer. . . . .	6
1.6	Reacções químicas entre o PVP e os iões de prata. . . . .	8
1.7	Esquematização do processo de Electrofiação. . . . .	12
1.8	Distribuição das moléculas de solvente nas poliméricas, dependendo da viscosidade da solução. . . . .	13
1.9	Esquematização do processo de Electrofiação Coaxial. . . . .	16
1.10	Ilustração esquemática da formação dos cones de Taylor na electrofiação coaxial . . . . .	16
1.11	Imagens SEM de nanofibras com estrutura <i>core-sheath</i> . . . . .	17
1.12	Efeito do diâmetro interno e da espessura externa na electrofiação coaxial . . . . .	17
1.13	Imagem TEM: secção transversal na nanofibra <i>core-sheath</i> com colapso no interior. . . . .	18
1.14	Dependência da tensão aplicada na formação da fibra coaxial. . . . .	19
2.1	Sistema de electrofiação simples utilizado. . . . .	24
2.2	Montagem experimental usada na electrofiação coaxial. . . . .	25
2.3	Ilustração do esquemático da montagem do injector coaxial em corte. . . . .	26
2.4	Representação da secção recta do injector coaxial composto pelos capilares interno e externo. . . . .	26
2.5	Imagens das grelhas usadas para colocar as amostras a analisar por TEM. . . . .	30
2.6	Montagens experimentais verticais de electrofiação. . . . .	30
2.7	Ilustração do modo de preparação da placa de poços para os testes de citotoxicidade. . . . .	32
3.1	Espectros de UV-vis das soluções PVP15_100 e PVP15_200. . . . .	34
3.2	Espectros de UV-vis das soluções PVP15_100 (na parte superior da figura) e PVP15_200. . . . .	35

3.3	Células de quartzo com a solução PVP15_100. . . . .	36
3.4	Espectro de absorvância e foto da solução PVP15_100. . . . .	36
3.5	Imagens da solução PVP15_100 exposta à luz ambiente numa célula de quartzo. . . . .	37
3.6	Caracterização das AgNPs produzidas na solução PVP15_100. . . . .	37
3.7	Imagens de TEM das partículas e respectivo histograma. . . . .	38
3.8	Imagens obtidas da matriz produzida a partir da solução PVP15_100 por TEM e respectivo histograma. . . . .	38
3.9	Imagens obtidas por microscopia óptica das fibras electrofiadas a partir da solução S6. . . . .	39
3.10	Imagens de SEM de fibras electrofiadas a partir da solução S6. . . . .	40
3.11	Imagens obtidas da matriz por TEM e respectivo histograma. . . . .	40
3.12	Imagens obtidas por microscopia óptica de fibras coaxiais . . . . .	43
3.13	Imagens de SEM das fibras coaxiais. . . . .	45
3.14	Imagens de TEM da matriz de nanofibras coaxiais. . . . .	46
3.15	Análise espectrofotométrica da libertação de AgNPs ao longo do tempo de imersão em água. . . . .	47
3.16	Espectros de UV-vis da libertação de AgNPs a partir de matrizes de nanofibras. . . . .	48
3.17	Representação gráfica da libertação de AgNPs a partir de matriz de nanofibras coaxiais ao longo do tempo. . . . .	48
3.18	Representação gráfica da viabilidade celular relativa (%) do ensaio I. . . . .	49
3.19	Espectros de UV-vis dos meios condicionados pelo extracto das matrizes de nanofibras simples e coaxiais, para a razão de 15 mg/mL. . . . .	50
3.20	Representação gráfica da viabilidade celular relativa (%) do ensaio II. . . . .	50
3.21	Representação gráfica da viabilidade celular relativa (%) do ensaio III, para os diferentes tempos de incubação. . . . .	51
3.22	Representação gráfica da viabilidade celular relativa (%) do ensaio IV, para os diferentes tempos de incubação. . . . .	52
3.23	Espectros de UV-vis dos meios condicionados pelo extracto das matrizes. . . . .	53
3.24	Viabilidade celular da sementeira após 48 horas de incubação com meios condicionados correspondentes a diferentes concentrações mg/mL. . . . .	53
3.25	Representação gráfica da absorvância como medida da actividade celular, em função da concentração de AgNO <sub>3</sub> no meio de cultura. . . . .	54
A.1	Esquema de contagem do hemocitómetro . . . . .	64

# Lista de Tabelas

1.1	Técnicas de produção química de nanopartículas de prata. . . . .	9
1.2	Técnicas de produção física de nanopartículas de prata. . . . .	10
1.3	Efeitos das alterações dos parâmetros do processo de electrofiação na morfologia das fibras. . . . .	15
1.4	Requisitos das soluções poliméricas a co-electrofiar. . . . .	19
2.1	Composição das soluções preparadas para a produção de AgNPs. . . . .	22
2.2	Composição das soluções consideradas para o processo de electrofiação simples. . . . .	23
2.3	Parâmetros de electrofiação utilizados na produção de matrizes a partir da solução S6. . . . .	24
2.4	Parâmetros de electrofiação coaxial utilizando como solução interna PVP15_100 e como externa PCL12_DMF2_Clorof8. . . . .	27
2.5	Valores das condutividades usadas na calibração do condutímetro. . . . .	27
3.1	Parâmetros de electrofiação utilizados nos testes realizados tendo em vista a produção da matriz com AgNPs por electrofiação simples. . . . .	39
3.2	Condutividades das soluções e de solventes. . . . .	41
3.3	Condutividade da solução externa para diferentes concentrações de LiCl. . . . .	42
3.4	Parâmetros de electrofiação utilizados nas soluções de PVP com AgNPs e nas de PCL em DMF e clorofórmio. . . . .	42
3.5	Parâmetros de electrofiação coaxial utilizando como solução interna PVP15 e como externa PCL12_DMF2_Clorof8. . . . .	43
3.6	Densidade das soluções interna e externa usadas na electrofiação coaxial. . . . .	44



# Lista de símbolos

$\lambda$	Comprimento de Onda
$\rho$	Densidade
$\phi$	Caudal
$M$	Massa molar



# Lista de siglas e abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgNPs	Nanopartículas de Prata
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro de bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMF	Dimetilformamida
DMF2_Clorof8	Mistura de solventes numa razão de 2:8 em massa
DMSO	Dimetilsulfóxido
e <sup>-</sup>	Electrão (ou electrões)
EC	Electrofiacção coaxial
ES	Electrofiacção simples
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
GSH	Glutathione
H.R.	Humidade relativa
LDH	Lactato desidrogenase
LiCl	Cloreto de lítio
MIC	Concentração mínima inibitória (do inglês <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> )
m/m	Razão massa por massa
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
m/V	Razão de massa por volume
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCL	Policaprolactona
PCL12_DMF2_Clorof8	Concentração de 12% em massa de PCL numa mistura de solventes de DMF clorofórmio numa razão mássica de 2:8, respectivamente
PVP	Polivinilpirrolidona
PVP:AgNO <sub>3</sub>	Razão entre a quantidade mássica de PVP e AgNO <sub>3</sub> na solução
PVP15	Concentração de 15% em massa de PVP (sem prata)
PVP15_100	Concentração de 15% em massa de PVP com AgNO <sub>3</sub> numa proporção de 100:1
PVP15_200	Concentração de 15% em massa de PVP com AgNO <sub>3</sub> numa proporção de 200:1

ROS	Espécies reactivas de oxigénio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> )
SEM	Microscopia electrónica de varrimento (do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
SPR	Ressonância plasmónica superficial (do inglês <i>Ressonance Plasmonic Surface</i> )
TEM	Microscopia electrónica de transferência (do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
Uv-vis	Ultravioleta-visível
VC	Viabilidade celular
V/V	Razão volume por volume



# Capítulo 1

## Enquadramento Teórico

### 1.1 Introdução

A prata, sob a forma coloidal, é um agente biocida, cujo uso, aprovado pela *Food and Drugs Administration*, remonta a 1920. Esta, na forma de iões de prata e de nanopartículas, tem uma acção antimicrobiana eficaz que se situa ao nível nanomolar e, nestas quantidades, não se revela tóxica [1]. As nanopartículas de prata (AgNPs) podem ser sintetizadas a partir de soluções de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), e a sua presença confirmada por um pico nos 400-420 nm nos espectros de UV-vis. As matrizes de nanofibras electrofiadas com AgNPs encapsuladas, por apresentarem uma elevada área de superfície, grande porosidade e poros de pequenos tamanhos, podem funcionar como barreira à penetração de agentes infecciosos e servir de meio de libertação da prata. Porém, a libertação de fármacos é demasiado rápida [2]. Este problema pode ser ultrapassado pelo encapsulamento de AgNPs no interior de nanofibras através da electrofiação coaxial. Assim neste estudo, foram usados dois polímeros, polivinilpirrolidona (PVP) e policaprolactona (PCL), que têm diferentes comportamentos em meio aquoso, o primeiro é solúvel e o segundo é insolúvel e hidrofóbico. É então expectável que as nanofibras exibam hidrofilicidade e relativa estabilidade, de forma a permitir uma libertação controlada e prolongada da prata encapsulada no seu interior.

#### 1.1.1 Espectrofotometria de UV-vis

A espectrofotometria é um método analítico baseado na interação da energia radiante (radiação electromagnética) com a matéria. Quando estimulada pela radiação, a molécula do composto pode sofrer transições electrónicas por absorção de energia quantizada. O espectro electrónico de absorção é o registo gráfico da resposta do sistema ao estímulo, obtendo-se uma banda de absorção caracterizada pela posição e intensidade. A posição corresponde ao comprimento de onda ( $\lambda$ ) da radiação responsável pela transição electrónica; a intensidade depende da energia das orbitais moleculares. Desta forma, é possível detectar a presença de espécies moleculares em soluções de acordo com o  $\lambda$  absorvido.

A análise do espectro de absorvância obtido por espectrofotometria de Ultravioleta-visível (UV-vis) permite detectar a presença das AgNPs e caracterizá-las. O pico associado à ressonância plasmónica superficial (SPR) característico das AgNPs é localizado em torno dos 400-420 nm. A SPR corresponde à oscilação colectiva dos electrões de condução em fase com a radiação electromagnética incidente. Assim, tanto a formação de AgNPs como a sua libertação a partir das fibras onde estão incorporadas

podem ser monitorizadas por este processo.

Na figura 1.1 estão ilustrados vários espectros de absorvância, resultantes da libertação contínua de AgNPs das matrizes, tal que a intensidade máxima da SPR correspondente aos 400 nm aumenta gradualmente em relação ao tempo de imersão [3].

Também pelo espectro UV-vis se analisa o tamanho das nanopartículas, uma vez que um  $\lambda$  elevado está associado a tamanhos maiores [4].

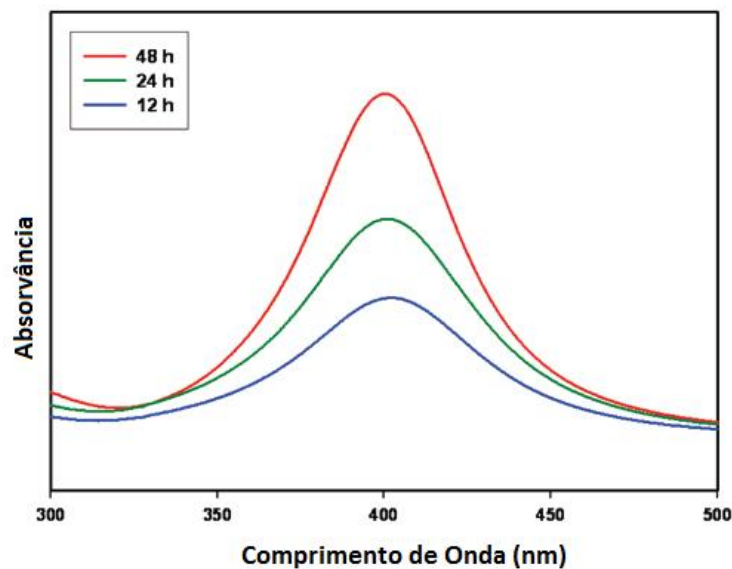


Figura 1.1: Espectro de UV-vis das AgNPs libertadas a partir de nanofibras de Ag/PMMA para água destilada [3].

## 1.2 Acção celular da Prata

### 1.2.1 Acção Microbiológica da Prata

Ao longo dos tempos a prata foi utilizada na prevenção de infecções em feridas, tais como queimaduras. O desenvolvimento de resistência a antibióticos de várias estirpes de microorganismos tornou-se num grave problema de saúde pública, e conduziu à necessidade de estudar novos agentes antimicrobianos eficazes. As nanopartículas de metais nobres, como as nanopartículas de prata (AgNPs), tornaram-se alvo de estudo devido ao reconhecimento da acção antimicrobiana da prata. São hoje várias as suas aplicações na área médica [5], desde o ambiente hospitalar (dispositivos médicos, como máscaras cirúrgicas e implantes [6]), até fins terapêuticos (agentes antimicrobianos para combater e impedir a colonização bacteriana).

As nanopartículas apresentam propriedades antimicrobianas eficazes dada a sua grande superfície e, consequentemente, à sua grande área de contacto com as células. A acção antibacteriana das nanopartículas de prata tem sido estudada sobretudo em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As alterações morfológicas e estruturais observadas nas bactérias evidenciam a actividade das AgNPs, que impede o seu desenvolvimento e propagação, tanto por inibição da proliferação (agente bacteriostático) ou por lise celular (agente bacteriolítico).

Quando as AgNPs entram em contacto com o meio celular ocorre a libertação de iões de prata ( $\text{Ag}^+$ )

[6].

Mecanismos de inibição em duas estirpes de bactérias, *E. coli* e *S. aureus*, tratadas por AgNPs foram observados e apresentaram alterações morfológicas idênticas, verificadas por imagens de TEM (do inglês *Transmission Electron Microscopy*): a membrana citoplasmática descolou-se da parede celular e as moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico) ficaram condensadas. A existência de prata à volta da parede celular ou no interior da célula sugere o seguinte mecanismo: o ADN perde a sua capacidade de se replicar e as proteínas tornam-se inactivas (desnaturadas) com o tratamento de  $\text{Ag}^+$ , devido à sua afinidade com grupos tiol (cistina e cisteína) e de fosfato presentes em proteínas e componentes da membrana celular [6]. A bactéria Gram-negativa, *S. aureus*, apresentou uma menor reacção, uma vez que a parede celular protege a célula da penetração de  $\text{Ag}^+$  no citoplasma [7]. Outros resultados mostraram que os  $\text{Ag}^+$  afectam tanto a expressão da subunidade proteica do ribossoma, como a de outras enzimas e proteínas. Verificou-se então que a primeira e principal acção antimicrobiana dos iões de prata nas bactérias se processa com o ribossoma, e de seguida ocorre a inibição da expressão das enzimas e proteínas necessárias à produção de ATP (adenosina trifosfato) que compromete a actividade metabólica [8].

Sondi et al. [9] estudou a actividade antimicrobiana de AgNPs na *E. coli* como modelo de bactéria Gram-negativa, confirmando o mecanismo de inibição de  $\text{Ag}^+$ . A interacção das nanopartículas com as células bacterianas foi estudada com técnicas de SEM (do inglês *Scanning Electron Microscopy*) e TEM, cujos resultados confirmaram que as células tratadas com AgNPs estavam danificadas, mostrando a formação de poros na parede celular bacteriana e a acumulação de AgNPs na membrana. Estas alterações morfológicas e estruturais devem-se ao facto das AgNPs terem grande afinidade com a membrana celular, à qual se liga causando rupturas, que levam à formação de poros. Consequentemente a permeabilidade celular aumenta, permitindo a entrada das AgNPs, figura 1.2. O aumento da permeabilidade da membrana resulta então na morte celular. Num estudo da actividade antimicrobiana de AgNPs em leveduras, *E.coli* e *S. aureus*, verificou-se que as leveduras e a *E.coli* foram inibidas a baixa concentração de AgNPs, enquanto que o efeito inibitório do crescimento da *S. aureus* foi moderado, para as mesmas concentrações, corroborando com a dependência da concentração na actividade antimicrobiana e que a *S. aureus* tem uma maior resistência [6]. Os estudos realizados por Kim et al. [6] sugerem que existem radicais livres derivados da superfície das AgNPs e que também são responsáveis pela actividade antimicrobiana, dado que podem atacar a camada lipídica da membrana celular, destruindo-a.

O tamanho das nanopartículas determina diferentes áreas de contacto da prata com as células bacterianas. Quanto maior for esta área maior será a interacção [4] [9] [10]. As nanopartículas inferiores a 10 nm interagem directamente com a respectiva bactéria Gram-negativa (*E. coli*, *V. cholera*, *P. aeruginosa* e *S. typhus*), actuando em três passos: as nanopartículas ligam-se à superfície da membrana celular, destruindo a sua integridade pela perturbação das suas várias funções, como respiração e permeabilidade; podem então penetrar a bactéria e causar-lhe danos, devido à possibilidade de interacção com componentes com enxofre e fósforo, como é o caso do ADN; e por fim, as nanopartículas libertam os iões de prata, que contribuem para os efeitos bactericidas [4] [7].

A eficácia da atividade antimicrobiana das nanopartículas também depende da sua forma, conforme se verificou em vários estudos de inibição do crescimento bacteriano. De acordo com Pal et al. [10], nanopartículas triangulares exibem uma inibição bacteriana eficaz, já as de forma esférica necessitam de estar presentes em maior concentração para desempenhar a mesma inibição. Assim, verifica-se que nanopartículas de diferentes formas têm diferentes efeitos nas células bacterianas.

Também foi estudada a actividade de prata coloidal através da redução do complexo catiónico  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  com quatro sacarídeos: dois monossacarídeos- glucose e galactose, e dois dissacarídeos- maltose e lac-

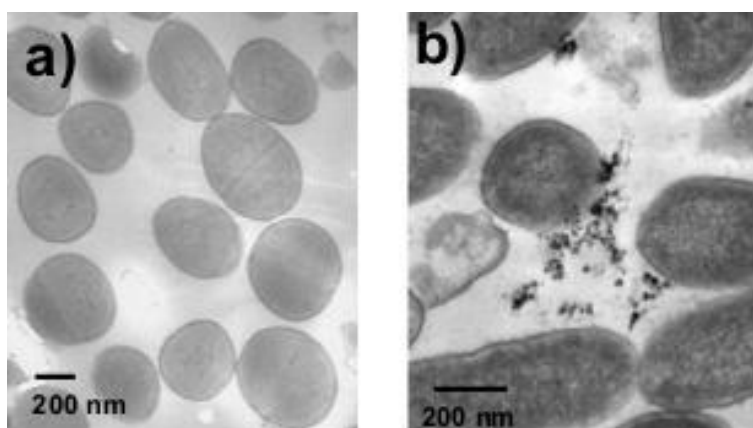


Figura 1.2: Imagens TEM de amostras de bactérias *P. aeruginosa*. a) Imagem da amostra de controlo, ie, sem AgNPs. b) Amostras previamente tratadas por AgNPs. As AgNPs podem ser observadas no interior da bactéria, assim como os danos provocados na membrana celular são visíveis por comparação com a amostra de controlo. Adaptado de [4].

tose [11]. A redução do complexo pela maltose produziu partículas de prata, que mostraram elevada actividade biocida em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cadeias multirresistentes, como *S. aureus*. A síntese de complexos de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) com os aminoácidos histidina e triptófano apresentaram uma boa actividade antimicrobiana, sendo o triptófano mais eficaz, e revelaram uma baixa toxicidade para ambos os aminoácidos [12].

A eficácia antimicrobiana de um composto de prata também é influenciada pelo estado de oxidação da prata, tal que  $\text{Ag(I)}$ , primeiro estado de oxidação, tem uma capacidade biocida mais forte em relação a  $\text{Ag(II)}$  e a  $\text{Ag(III)}$ , que também são menos comuns. O modo de preparação de materiais com prata tem um forte impacto no seu comportamento [1].

### 1.2.2 Toxicidade da Prata

Os humanos estão expostos diariamente a baixos níveis de prata existentes na comida, água e no ar ( $1 \times 10^{-6} \mu\text{g L}^{-1}$ ), figura 1.3. Os compostos de prata absorvidos podem induzir efeitos crónicos e agudos, incluindo danos em tecidos e órgãos [1]. Na literatura, apenas alguns estudos descrevem resultados *in vitro* e *in vivo* relativos à citotoxicidade da prata. Foi relatada uma reacção inflamatória crónica em pacientes com válvulas cardíacas revestidas de prata, com uma concentração de prata no sangue de  $22 \mu\text{g L}^{-1}$  (quando o normal é  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), tal como situações de alergias e hipersensibilidade, enquanto outros estudos descrevem o efeito não citotóxico da prata. A toxicidade crónica da prata é observada na argíria, patologia que afecta indivíduos que ingerem prata metálica e compostos de prata em pequenas doses [1], como por exemplo situações em que se cobrem queimaduras com sais de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) [13]. Os médicos e os cientistas acreditam que a descoloração da pele é o efeito mais grave que a prata pode provocar na saúde. A gravidade dos danos provocados nos tecidos e órgãos é dependente da dose, e para baixas concentrações não têm sido registados efeitos colaterais, estimando-se que a dose letal do  $\text{AgNO}_3$  é  $1.4 \times 10^5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  em humanos [1].

As AgNPs são consideradas como não tóxicas, no entanto, devido ao seu pequeno tamanho e às suas várias propriedades são sugeridas como perigosas para o meio ambiente [14], exibindo uma maior toxicidade devido à sua maior área de superfície e uma maior libertação iónica, de tal forma que conseguem ultrapassar com maior facilidade barreiras [1]. Também estudos realizados revelaram que

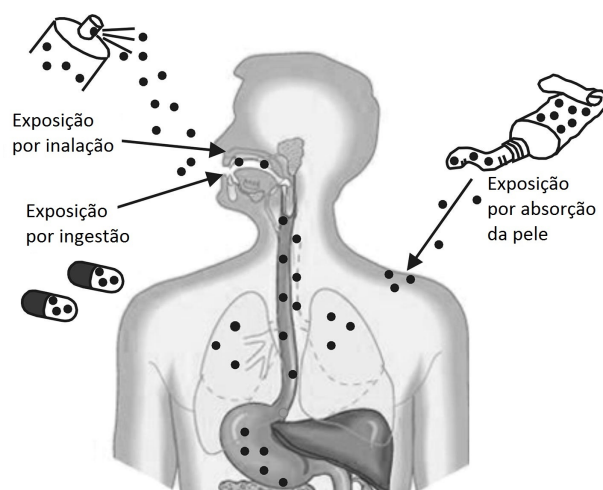


Figura 1.3: Os três meios de exposição do corpo humano a compostos de prata. Adaptado de [1].

as pequenas AgNPs são mais tóxicas do que as de maiores dimensões, e que os iões de prata são mais tóxicos [15] [16].

Hussain et al. [17] estudou a toxicidade de AgNPs em células de fígado de ratos (BRL3A), e verificou que, após 24 horas de exposição, as mitocôndrias (organelos que acarretam um papel crucial na respiração celular) apresentavam tamanhos anormais e formas irregulares. Braydich-Stolle et al. publicou um estudo da toxicidade de AgNPs em células C18-4 (células estaminais espermatogónicas), e verificou que a actividade citotóxica das AgNPs aumenta com a sua concentração, sendo dependente da dose [1] [6] [14]. De facto, as NPs podem causar efeitos tóxicos como inflamação, activação celular, depleção do nível de glutathione (GSH- proteína que funciona como o indicador mais sensível da célula à toxicidade da prata) associada à disfunção mitocondrial e produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), que também conduz ao stress oxidativo celular [16]. A indução da acumulação de ROS pode iniciar uma resposta inflamatória, uma perturbação e destruição mitocondrial, causando uma redução da viabilidade celular, dado que também danifica o ADN. Todos estes processos levam à necrose e/ou apoptose [1] [17], dependendo da dose e do tempo de exposição [16]. No entanto, a forma exacta que justifique a citotoxicidade das AgNPs não está totalmente compreendida [1].

### 1.2.3 Métodos *in vitro* de avaliação da actividade antimicrobiana e citotoxicidade

Vários métodos (cinética antibacteriana, concentração mínima inibitória -MIC, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*- e a técnica de Kirby-Bauer) são aplicados de forma a avaliar as propriedades antibacterianas de agentes biocidas.

Para o teste cinético, preparam-se tubos de ensaio com uma quantidade equivalente de composto de prata no estado sólido e com pequenos volumes de suspensão de células bacterianas. Estas preparações são observadas ao longo do tempo para se contar o número de colónias sobreviventes. Os resultados da percentagem de redução de colónias (taxa de mortalidade) em função do tempo são representados graficamente, tal como o exemplo representado na figura 1.4. A percentagem de redução é determinada com base na equação 1.1, onde A é o número de colónias bacterianas sobreviventes na solução de controlo e B na solução com composto de prata. Com o aumento do tempo, verifica-se um aumento da percentagem de redução que se aproxima de um valor assintótico, figura 1.4 [3].

$$\% \text{redução} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (1.1)$$

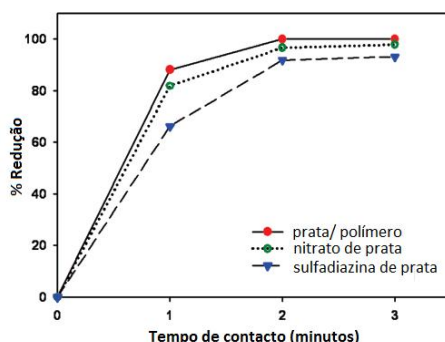


Figura 1.4: Gráfico da percentagem de redução em função do tempo (minutos) de colónias de *E. coli* em diferentes compostos de prata (nanofibras prata/polímero,  $\text{AgNO}_3$  e sulfadiazina de prata). Adaptado de [3].

A MIC é também um estudo quantitativo da actividade antimicrobiana de nanofibras prata/polímero, que consiste na menor concentração do agente biocida capaz de inibir a proliferação de microorganismos. As soluções com o agente bactericida são sucessivamente diluídas às quais são adicionadas suspensões bacterianas com a mesma concentração. Verifica-se então o crescimento ou inibição em função da concentração dos compostos de prata [3].

Na técnica de Kirby-Bauer, os compostos de prata são sedimentados e colocados numa placa de agar com células bacterianas. A propriedade antibacteriana é medida pela zona limpa da inibição à volta da sedimentação, 24 horas após a incubação. A figura 1.5 mostra que, no estudo desenvolvido por Kong et al., o diâmetro de inibição da nanofibra é de 45 mm (com 13 mm de diâmetro de sedimentação).

Para avaliar a citotoxicidade existem testes *in vitro* designados pelos autores como testes de contacto

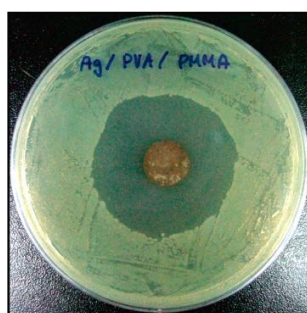


Figura 1.5: Imagens da zona de inibição de nanofibras de prata/polímero pela técnica de Kirby-Bauer. Adaptado de [3].

directo [18] e de contacto indirecto [19]. O teste de contacto directo baseia-se na colocação de amostras do material a avaliar directamente no meio onde foram semeadas células [18]. Já o teste de contacto indirecto, neste caso também designado por teste de extracto [20], consiste na colocação do extracto do material em contacto com uma cultura de células, durante 24 horas. O extracto consiste no meio de cultura onde foi adicionado e depois retirado o material a analisar [19].

Ao adicionar a estes métodos testes colométricos (testes de MTT, LDH e Vermelho Neutro) [21], a fluorescência e a absorvância dão uma indicação da actividade metabólica celular e, portanto, da viabilidade celular (VC) [18].

O teste de MTT (do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) baseia-se na

redução dos sais amarelos de tetrazólio por desidrógenases (enzimas mitocondriais), que são convertidos em *formazan* de cor púrpura, medindo a actividade enzimática mitocondrial. Deste modo, a quantidade de MTT reduzido é proporcional ao número de células viáveis, e portanto quanto menor for a VC, menor será a redução do MTT e menor será o sinal espectrofotométrico obtido [22].

O teste de LDH (lactato desidrogenase) detecta os danos na membrana celular. Consiste na redução do NAD em NADH pela LDH, enzima libertada para o meio extracelular quando a integridade celular é posta em causa. O NADH é usado na conversão de um substrato num produto corado, analisado por espectrofotometria de UV-vis, tal que quanto maior for a perda de integridade membranar maior é o sinal obtido [21].

O teste do Vermelho Neutro baseia-se na capacidade das células viáveis incorporarem este corante ao nível dos lisossomas. Alterações na membrana lisossomal resultam numa redução da incorporação do corante, podendo-se distinguir as células viáveis (incorporam o vermelho neutro, tendo maior sinal espectrofotométrico) das inviáveis [21].

A viabilidade celular é determinada pelo tratamentos dos resultados obtidos por espectrofotometria: calcula-se a média das medidas de absorvância de cada diluição, do branco (controlo do meio) e do controlo celular; subtração da média do branco às médias do controlo e da diluição, obtendo-se a VC pela equação 1.2, onde ODD é a média da densidade óptica da diluição e ODC do controlo [20].

$$VC = \frac{ODD}{ODC} \times 100 \quad (1.2)$$

## 1.3 Produção de nanopartículas de prata e de fibras coaxiais

### 1.3.1 Produção de Nanopartículas de Prata

A produção das nanopartículas de prata tem sido explorada nos últimos anos de forma a que se produzam partículas com forma e tamanho uniformes, melhorando as suas propriedades ópticas.

A síntese assenta em dois grandes grupos: produção química e física. É utilizado um agente químico redutor dos iões de prata em meio aquoso que produz pequenos aglomerados de prata reduzida. A abordagem química abrange várias técnicas tais como a redução química, redução electroquímica, redução fotoquímica e micelas reversas. No caso da abordagem física, a redução dos iões de prata é promovida por processos físicos como irradiação, com radiação ultravioleta (UV), gama, micro-ondas, ultra-sons e por ablação por laser [23].

A utilização de um agente estabilizador é muito importante na síntese de nanopartículas. A polivinilpirrolidona (PVP), polímero sintético e solúvel em água, é o agente estabilizador mais utilizado na literatura para a produção de AgNPs, uma vez que as protege e estabiliza, inibindo o seu crescimento e a sua aglomeração. Tal facto acontece porque o grupo amida (N) do PVP coordena-se com a prata formando uma camada protectora na superfície das partículas com um diâmetro inferior a 50 nm, figura 1.6. Em partículas maiores, de 500-1000 nm, tanto o N como o oxigénio (O) coordenam-se com a prata [24]. Embora o pirrolidil ( $C_4H_8N$ ) tenha um efeito estérico (cada átomo de uma molécula ocupa um determinado espaço) na coordenação entre o N e  $Ag^+$ , a electronegatividade do átomo de azoto é menor do que a do átomo de oxigénio, pelo que a sua capacidade de ceder electrões é maior do que a do O. Como para pequenos diâmetros o efeito estérico não é o principal factor que influencia a reacção entre o PVP e a prata, a coordenação ocorre entre o átomo de azoto e os iões de prata. Com o aumento do diâmetro, o efeito estérico é reforçado, pelo que o O também se coordena com a prata [25]. No entanto, o PVP também actua com agente redutor devido aos átomos de oxigénio do

grupo polar imida, que têm uma forte afinidade aos cátions de prata, cedendo-lhes electrões [26]. A N,N-dimetilformamida (DMF) é um composto orgânico muito utilizado como solvente e agente redutor forte na produção de nanopartículas de prata [26]. A equação de oxidação-redução desta reação à temperatura ambiente foi proposta por Pastoriza-Santos et al. [27], equação 1.3, onde a DMF ( $\text{HCONMe}_2$ ) é o agente redutor, que origina o ácido carbâmico ( $\text{Me}_2\text{NCOOH}$ ), e os iões de prata,  $\text{Ag}^+$ , os agentes oxidantes. Enquanto esta reação prossegue a condutividade aumenta, indicando que os  $\text{Ag}^+$  dão lugar a iões de Hidrogénio ( $\text{H}^+$ ).



As AgNPs têm sido sintetizadas recorrendo a vários agentes precursores da prata, agentes redutores e estabilizadores. As tabelas 1.1 e 1.2 apresentam algumas metodologias da produção de AgNPs reportadas na literatura.

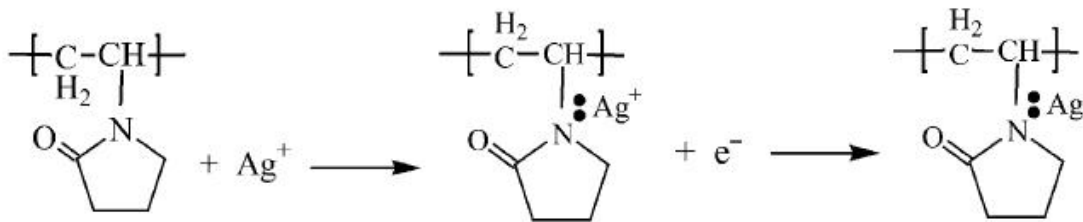


Figura 1.6: Reacções químicas entre o PVP e os iões de prata. Adaptado de [25].



Tabela 1.1: Técnicas de produção química de nanopartículas de prata.

Produção Química				
Técnica	Percursor	Agente Estabilizador \ Protector	Agente Redutor	Químicos com outras funções
Redução Química	Sulfato de Prata ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ) [29] $\text{AgNO}_3$ [24] [27] [30] [31] [32]	Octadecilamina (ODA) [29]  3-aminopropiltriethoxisilano (APS) [27]  Polivinilpirrolidona (PVP) [24] [31] [32]	Boroidreto [29]  Citrate de sódio [30]  Dimetilformamida (DMF) [27]  Álcool (poliol) [31]  Glicose [24]  Etilenoglicol [32]	
Redução Electroquímica	$\text{AgNO}_3$ [28] [33]  $\text{AgCl}$ [34]	PVP (PVPK30) [28]	         Brometo de Tetraetilamónio [34]	Cátodo de platina, e $\text{KNO}_3$ (nitrato de potássio) como solução electrolítica. Não é usado outro agente específico como redutor [28] [33]
Redução Fotoquímica	$\text{AgNO}_3$ [35] [36] [37]  Trifluoroacetato de prata [38]	Poliamidoamina (PAMAM) [35]   PVP [37]   Ciclohexilamina [38]	Não é necessário um agente específico como redutor [35]  Polímero metoxipoliethilenoglicol (MPEG) actua como agente redutor [36]  Radicais cetil [38]	Radiação UV ( $\lambda=254\text{ nm}$ ) promove a redução [35] [36] [37] [38]  Produção de AgNPs fluorescentes (AgFNPs); tolueno como solvente [38]
Aquecimento por Micro-ondas [39]	$\text{AgNO}_3$	Poliacrilamida	Hidrazina hidratada	
Micela Reversa [40]	$\text{AgNO}_3$		Ácido ascórbico	

Tabela 1.2: Técnicas de produção física de nanopartículas de prata.

Produção Física				
Técnica	Percursor	Agente Estabilizador \ Protector	Agente Redutor	Outro(s)
Radiação UV	AgNO <sub>3</sub> [41] [42]	Álcool Polivinil (PVA) [41]	Tionina actua como agente redutor na presença de luz visível [42]	
Micro-ondas [43]	Platina	PVP		
Ultra-sons [44]	AgNO <sub>3</sub>	Amido		Glicose funciona como mediadora e o NaOH como catalisador
Irradiação Gama [45]	AgNO <sub>3</sub>	Goma-arábica		
Ablação por Laser	Prata Metálica [46] [47]	Soluções aquosas de surfactantes C <sub>n</sub> H <sub>2n+1</sub> SO <sub>4</sub> Na (n=8, 10, 12, 16) [47]		Soluções aquosas de NaCl [46]
Dispersão de átomos metálicos solvatados (SMAD)[48]	Prata Metálica	2-butanona, trioctilfosfina e dodecano-tiol		Evaporação por laser seguida de amadurecimento
Redução Radiolítica [23]	AgNO <sub>3</sub>	PVA	Electrão hidratado proveniente da hidrólise funciona como redutor	Água destilada  Álcool isopropílico para limpar os radicais de H e hidroxilo

### 1.3.2 Produção de nanofibras

Com o objectivo de produzir nanofibras com uma estrutura controlada, a electrofiação (do inglês *electrospinning*) tem sido o método mais escolhido, graças à sua tecnologia simples e ao seu custo acessível.

As estruturas das nanofibras têm sido exploradas devido à sua vasta aplicação, desde a produção de matrizes na Engenharia de Tecidos, até ao encapsulamento e transporte de medicamentos e compostos biológicos [49].

De forma a melhorar e potenciar a utilização de nanofibras, surgiu uma variante da técnica designada electrofiação coaxial, também conhecido por "electrofiação de dois fluídos" [50], que permite a produção de nanofibras compostas por dois materiais diferentes, um no interior e outro à sua volta. Desta forma será possível encapsular nanopartículas de prata estabilizadas pelo PVP, camada interna, na policaprolactona (PCL), camada externa. Assim, espera-se controlar e prolongar a libertação das AgNPs, por forma a otimizar a sua utilização em cobertura de feridas para protecção à invasão de microorganismos.

#### Policaprolactona

Graças à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e às propriedades das fibras que formam, os poliésteres alifáticos são os materiais mais estudados dos polímeros biodegradáveis [51].

O PCL (do inglês  $\epsilon$ -*polycaprolactone*) é um polímero sintético, semi-cristalino e hidrofóbico, que pode ser obtido pela condensação do ácido 6-hidroxicapróico ou pela polimerização por abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona [52] [53] [54]. Como é um poliéster aprovado pela FDA (do inglês *Food and Drugs Administration*) por não ser tóxico e ser de baixo custo, e possui boas propriedades mecânicas [52]. À temperatura ambiente, é solúvel em clorofórmio, diclorometano, acetona, n-metilpirrolidona, dimetilformamida e tetrahidrofurano [53] [54].

Este polímero é bastante usado na electrofiação coaxial, sobretudo como camada externa, porque forma uma fibra capaz de encapsular uma camada interna (com drogas, proteínas, etc.) e libertá-la gradualmente [52].

### 1.3.3 Técnica de Electrofiação

A configuração do sistema de electrofiação consiste num tubo capilar metálico (agulha) que é polarizado positivamente, uma fonte de alta tensão, uma bomba infusora que controla o caudal a que uma solução polimérica é dispersa através do tubo capilar, e um plano colector metálico ligado à terra, figura 1.7 [49].

Com o aumento da tensão de polarização, a gota que surge na ponta do capilar adquire uma forma cónica, designada de cone de Taylor. Esta forma deve-se à tensão superficial da solução, à carga eléctrica na solução, e à força electroestática que está a actuar. Quando o potencial aplicado aumenta e atinge um ponto em que a força electroestática é superior à tensão superficial da solução, forma-se um fino jacto da solução. A solução polimérica carregada positivamente que sai do capilar é acelerada em direcção ao colector sob um campo electroestático que a conduz ao colector. Durante o trajecto entre a agulha e o colector, o jacto adquire uma forma de "chicote" devido à repulsão do excesso de cargas. Nesta fase, o solvente evapora e as fibras secas depositam-se no colector, orientadas aleatoriamente. Vários parâmetros afectam o tamanho e qualidade das fibras produzidas: características da solução

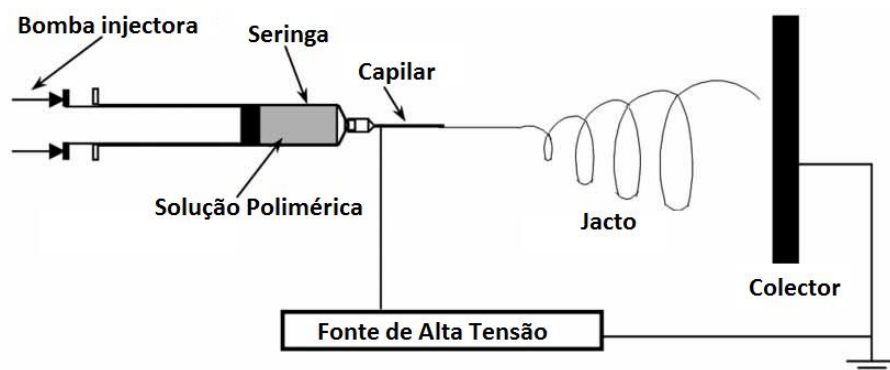


Figura 1.7: Esquematização do processo de Electrofiação. Adaptado de [49].

(como a viscosidade, tensão superficial, condutividade e peso molecular), do processo, tais como o valor da tensão aplicada, a velocidade de ejeção do polímero (caudal), o tamanho do capilar (diâmetro da agulha) e a distância entre o capilar e o coletor. Também as condições envolventes como a temperatura e humidade interferem na morfologia das fibras [49].

## Parâmetros da solução polimérica

### Viscosidade e concentração

A viscosidade da solução, controlada pela concentração do polímero, determina o tamanho e morfologia das nanofibras. Para baixas concentrações, ou seja pouca viscosidade, a solução escorre e, ao ser aplicada uma tensão, ocorre *electrospraying*. Como nesta situação há uma grande quantidade de moléculas de solvente em relação ao número de entrelaçamentos poliméricos, pelo que a tensão superficial será elevada, as fibras apresentam aglomerados esféricos, designados de contas. Quando a viscosidade aumenta, as forças viscoelásticas aumentam devido ao aumento do número de entrelaçamentos das cadeias poliméricas. Estas forças começam a sobrepor-se à tensão superficial, e as contas transformam-se em fusos, aglomerados mais achatados. Para soluções demasiado concentradas, e portanto demasiado viscosas, forma-se uma gota seca na ponta da agulha antes do jacto se formar, não ocorrendo o processo de electrofiação. O diâmetro das fibras aumenta com a concentração. Para a mesma concentração, quanto maior for o peso molecular do polímero maior será a viscosidade da solução [56] [57] [58] [59].

### Peso molecular do polímero

O peso molecular representa o tamanho da cadeia polimérica, e portanto está relacionado com a viscosidade, uma vez que influencia a quantidade de entrelaçamentos das cadeias poliméricas no solvente. Também influencia a tensão superficial e a condutividade [57] [58] [59].

### Condutividade

A condutividade corresponde à capacidade da solução polimérica de conduzir carga elétrica, pelo que depende da composição da solução.

Na electrofiação, o estiramento depende da repulsão das cargas superficiais, logo quanto maior for o número de cargas transportadas pelo jacto (maior condutividade da solução) maior será o seu estiramento (maior a repulsão electrostática e maior a zona de instabilidade), formando fibras de tamanho menores. Soluções não condutoras não permitem a realização do processo [57] [58] [59]. O aumento

da condutividade pode ser conseguido com a adição de um sal ou de um álcool ao solvente [56].

### Tensão superficial

A tensão superficial é uma força que traduz o excesso de carga na superfície, gerado pela atracção das moléculas no sentido interior do líquido. No caso das moléculas do interior do líquido, como estas são atraídas em todas as direcções pelas moléculas vizinhas, a força resultante é nula. Desta forma, a tensão superficial depende da composição da solução: solvente(s) e polímero [18].

Quando a solução entra em contacto com o ar, a tensão superficial tende a reduzir a superfície do fluído exposta, pelo que se forma uma gota (e o fluído não escorre). Com a aplicação de um campo eléctrico, esta gota deforma-se e o jacto forma-se, sendo esta tensão vencida. No entanto, durante o trajecto no ar, quando a tensão superficial é elevada, esta pode ser responsável pela formação de contas.

Quando existe um número elevado de moléculas de solvente livres, estas têm tendência a agregar-se e a adoptar uma forma esférica devido à tensão superficial, figura 1.8 B). Tal problema pode ser contornado pelo aumento da concentração, e consequentemente da viscosidade, aumentando o número de cadeias entrelaçadas e da interação entre as moléculas de solvente e do polímero. Assim, no estiramento, as moléculas do solvente difundem-se pelas cadeias entrelaçadas do polímero, reduzindo a tendência de agregação das moléculas do solvente devido à tensão superficial, pelo que o número de contas diminui, figura 1.8 A). Quando a tensão superficial é demasiado elevada, ocorre *electrospraying* [57] [58] [59].

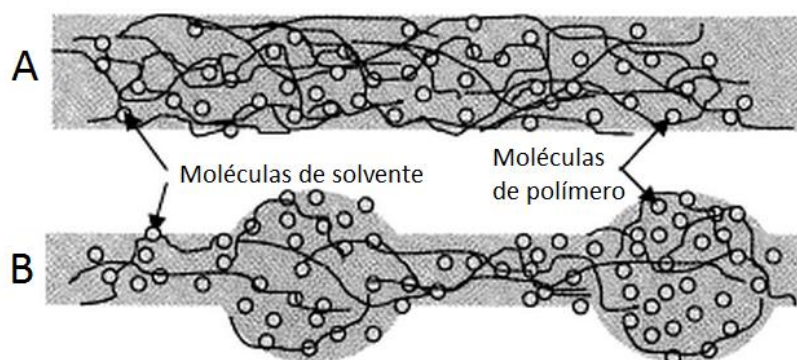


Figura 1.8: Distribuição das moléculas de solvente nas poliméricas, dependendo da viscosidade da solução. A) Com a viscosidade elevada, as moléculas de solvente estão distribuídas pelas moléculas poliméricas entrelaçadas. B) Com a viscosidade baixa, as moléculas de solvente têm tendência a agregar-se devido à acção da tensão superficial. Adaptado de [58].

### Parâmetros do processo

#### Caudal

O caudal é o parâmetro que controla a quantidade de solução que é injectada. Quando o seu valor é muito baixo, a quantidade de solução polimérica que chega à ponta do capilar é insuficiente e leva a que ocorram interrupções do jacto. Se for elevado, há acumulação da solução na ponta da agulha, dado que a tensão eléctrica aplicada não é suficiente para a extrair. No geral, baixos caudais produzem fibras de pequenos diâmetros. No caso de um caudal elevado, podem surgir contas e fusões, quando as fibras não têm tempo de secar antes de atingirem o colectador [56] [57] [58] [59].

### **Distância entre o capilar e o colector**

A distância entre a agulha e colector afecta principalmente o tempo de voo da solução e a intensidade do campo eléctrico. O processo de electrofiação requer uma distância mínima para permitir que as fibras tenham tempo suficiente para secar antes de se depositar no colector. Quando a distância é pequena, o tempo de voo também o é e a intensidade do campo eléctrico pelo contrário aumenta, acelerando as fibras em direção ao colector. Nesta situação, dado o pequeno tempo no ar, o solvente pode não ter tempo suficiente para evaporar, e caso as fibras se depositem húmidas, estas podem-se fundir.

No caso oposto, quando a distância é longa, o tempo de voo é maior, ocorrendo um maior alongamento das fibras, produzindo fibras de diâmetros menores. O campo eléctrico, por sua vez, é mais fraco, diminuindo a intensidade da corrente entre o capilar e o colector. Logo a repulsão das cargas transportadas no jacto diminui e a força de alongamento é menor. Quando a distância é muito grande, as fibras podem nem chegar ao colector [56] [57] [58] [59].

### **Tensão aplicada**

Uma alta tensão é aplicada à solução polimérica, polarizando-a, ou seja, induz cargas na solução, formando uma diferença de potencial entre a solução e o colector, e origina uma força electrostática suficiente para superar a tensão superficial da solução, iniciando o processo de electrofiação.

Quando a tensão aplicada é elevada, há um aumento do campo eléctrico e o tempo de voo encurta devido à maior aceleração das fibras em direção ao colector. Assim, a zona de instabilidade diminui, pelo que o estiramento do jacto será menor e, consequentemente, a fibra produzida terá um diâmetro maior. Um aumento do campo eléctrico também induz um aumento das cargas transportadas no jacto, aumentando a repulsão das cargas, aumentando o estiramento do jacto [56] [57] [58] [59].

### **Colector**

O colector é o local onde as fibras se depositam e que está ligado à terra. Como é condutor, este dissipa a carga das fibras, de modo a que as fibras já depositadas não repelem as seguintes. No caso de colectores não condutores, quando a carga não é dissipada, as fibras repelam-se, produzindo uma estrutura mais porosa. Também colectores com poros, como o papel e malhas de cobre, produzem fibras menos compactas, comparando com as fibras depositadas em folhas de alumínio. O colector rotatório permite o alinhamento das fibras. O movimento rotatório do colector também favorece que as fibras fiquem secas quando atingem o colector, porque a rotação dá mais tempo ao solvente para evaporar e aumenta a sua taxa de evaporação. Esta característica é importante em solventes como o DMF, que tem um ponto de ebulição elevado [56] [57] [58] [59].

### **Diâmetro do capilar**

O diâmetro interno da agulha interfere com a morfologia das fibras, tal que quando menor, menor será o diâmetro das fibras. Um diâmetro menor também diminui a probabilidade de entupimento do capilar, dada a menor exposição da solução no meio envolvente [57] [58] [59].

## **Parâmetros ambientais**

### **Temperatura**

A temperatura interfere com a taxa de evaporação do solvente e com a viscosidade da solução, tal que a viscosidade da solução polimérica diminui com o aumento da temperatura, e a taxa de evaporação

aumenta. Nesta situação, como as forças viscoelásticas diminuem, as forças electroestáticas repulsivas produzem um maior estiramento do jacto, resultando em fibras de diâmetros menores. Uma taxa de evaporação elevada promove a formação de fibras grossas, dado o aumento da viscosidade do jacto e reduz a formação de fusos [56] [57] [58] [59].

### Humidade

Humidades baixas favorecem a formação de fibras com maior diâmetro, pois a evaporação do solvente acompanhada de um aumento da viscosidade da solução, as forças viscoelásticas que se opõem ao estiramento aumentam. No caso de soluções não aquosas com polímeros não solúveis em água (como é o caso do PCL), o aumento da humidade provoca o aparecimento de pequenos poros circulares na superfície da fibra [56] [57] [58] [59].

Na tabela 1.3, estão expostos os efeitos das alterações dos parâmetros do processo de electrofiação na morfologia das fibras produzidas.

Tabela 1.3: Efeitos das alterações dos parâmetros do processo de electrofiação na morfologia das fibras. Adaptado de [58].

Parâmetro	Efeito na morfologia da fibra
<b>Viscosidade e concentração</b>	Baixas concentrações/viscosidades formam contas e fusos; o seu aumento diminui o número de defeitos. O diâmetro das fibras aumenta com a concentração/viscosidade.
<b>Condutividade</b>	O aumento da condutividade permite a produção de fibras uniformes e sem contas. O seu aumento resulta em fibras de menor diâmetro.
<b>Peso molecular</b>	O aumento do peso molecular reduz o número de contas.
<b>Tensão aplicada</b>	O diâmetro da fibra diminui com o aumento da tensão aplicada. Quando esta é demasiado elevada, há formação de contas.
<b>Caudal</b>	Baixos caudais produzem fibras de pequenos diâmetros.
<b>Distância agulha-colector</b>	É necessária uma distância mínima. Quando é muito grande ou muito curta, há formação de contas.
<b>Colector</b>	Collectores metálicos permitem uma deposição compacta; um colector rotatório permite o alinhamento das fibras.
<b>Diâmetro do capilar</b>	Um diâmetro interno pequeno promove a produção de fibras mais finas.
<b>Factores ambientais</b>	O aumento da temperatura causa uma redução no diâmetro das fibras. O aumento da humidade resulta na formação de fibras porosas.

### 1.3.4 Técnica de Electrofiação Coaxial

A electrofiação coaxial é muito semelhante à electrofiação simples. A diferença assenta-se sobretudo na fiação, que tem um capilar interno inserido num outro maior (externo), tal que a agulha externa contém a solução de revestimento e a interna a solução central. O sistema de produção pode ser horizontal, como o da figura 1.7, ou vertical, como o ilustrado na figura 1.9. Os caudais de ambas as soluções são controladas pela bomba infusora.

O processo também é bastante semelhante ao anteriormente descrito. Quando as soluções poliméricas estão carregadas positivamente pela aplicação de alta tensão, a acumulação de cargas ocorre predominantemente na superfície do líquido exterior que sai do capilar externo coaxial [49]. A gota da solução externa alonga e estica-se devido à repulsão das cargas formando o cone de Taylor e, assim que as

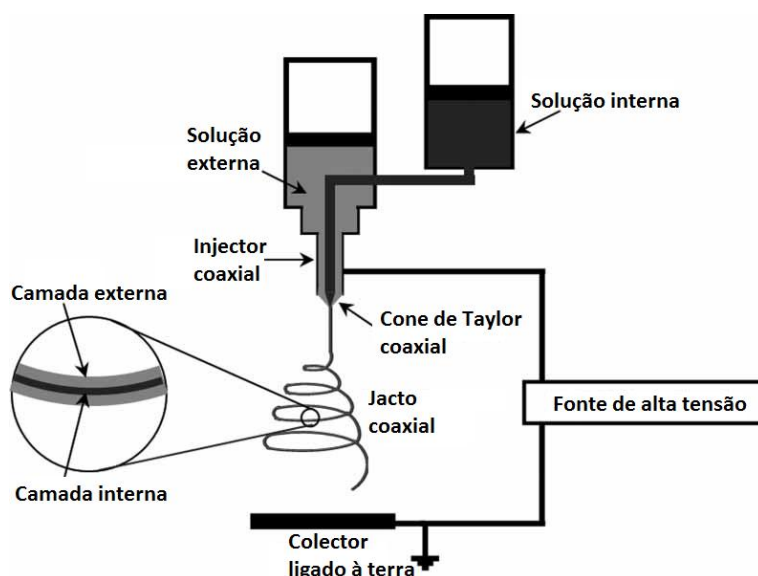


Figura 1.9: Esquematização do processo de Electrofiação Coaxial. Adaptado de [49].

cargas acumuladas atinjam um valor crítico devido ao aumento da intensidade do potencial aplicado, uma jacto fino forma-se a partir do cone. A tensão gerada pela solução externa causa o cisalhamento da solução interna por um "arrasto viscoso" e "contacto friccional". Assim, o líquido interno forma o seu cone de Taylor acompanhando o da solução externa, e um jacto composto coaxial desenvolve-se a partir da ponta dos cones, figura 1.10.

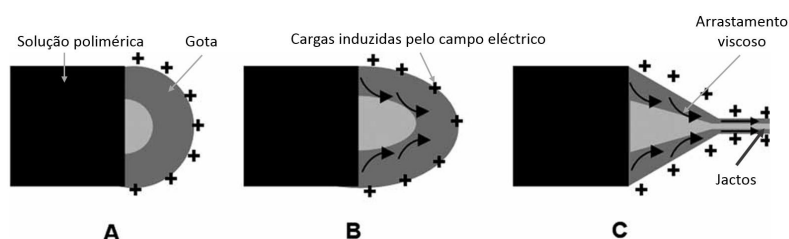


Figura 1.10: Ilustração esquemática da formação dos cones de Taylor na electrofiação coaxial: A) Cargas superficiais induzidas na solução externa devido ao campo eléctrico; B) Arrastamento viscoso exercido na solução interna pelo alongamento da gota da solução externa; C) Conjunto de cones de Taylor com a estrutura *core-sheath* (formado pelo contínuo arrastamento viscoso). Adaptado de [49].

Quanto mais estável for o cone, melhor será a incorporação da solução central na externa, de forma a formar a fibra com a estrutura *core-sheath*, figura 1.11. No caminho até ao colector (percurso no ar), o jacto que reúne os dois fluídos sofre uma flexão e segue uma trajectória em forma de "chicote", durante a qual os dois solventes evaporam e as nanofibras *core-sheath* são formadas e depositadas no colector.

Todos os parâmetros que afectam a qualidade do processo de electrofiação e da morfologia das fibras produzidas por electrofiação, também interferem na electrofiação coaxial.



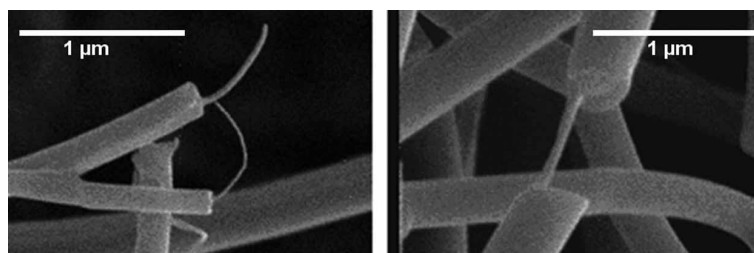


Figura 1.11: Imagens SEM de nanofibras com estrutura *core-sheath* (solução interna: PCL; solução externa: gelatina)[49].

## Parâmetros das soluções

### Viscosidade

A solução externa actua como guia e envolve o material interno. A viscosidade da solução externa tem de ser tal que a tensão transmitida ao fluido interior seja suficiente para ultrapassar a tensão superficial entre as duas soluções, permitindo a formação do cone de Taylor e do jacto. A viscosidade da solução de revestimento é crítica e o sistema polímero-solvente usado deve ser fiável, para que possibilite a formação da estrutura *core-sheath*. Em vários estudos verificou-se a quebra do jacto interno quando a sua viscosidade é bastante baixa. Logo, o fluido interno deve de ter uma viscosidade mínima para evitar a sua ruptura.

### Concentração

Tal como na electrofiação simples, também neste método se observa que o aumento das concentrações aumenta o diâmetro da fibra devido à presença de mais material no jacto [49]. Zhang et al. [60] variou a concentração da solução interna, mantendo a do revestimento constante, e verificou que o seu aumento provoca um aumento geral do diâmetro da fibra. O aumento do diâmetro do fluido interno implica uma diminuição da espessura do externo, dado que a mesma quantidade de massa externa tem de revestir uma maior quantidade interna, figura 1.12 B. O mesmo ocorre quando se mantém a concentração interna e se aumenta a externa, mas o diâmetro global aumenta, desta vez, devido ao aumento da espessura externa, figura 1.12 A.

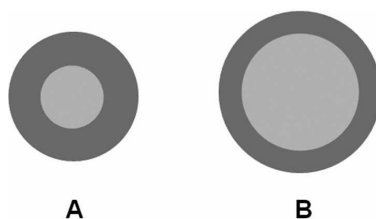


Figura 1.12: Efeito do diâmetro interno e da espessura externa na electrofiação coaxial: A) Pequeno diâmetro interno e maior espessura externa; B) Maior diâmetro interno e menor espessura externa [49].

### Miscibilidade e incompatibilidade

A interação entre as soluções (poliméricas ou solvente) interna e externa é um parâmetro muito importante. Em primeiro lugar, o solvente de uma solução não deve precipitar o polímero da outra solução, quando as soluções estão na ponta do capilar. Em segundo, a tensão superficial entre o fluido interior

e exterior deve ser a mínima possível para formar e estabilizar o cone de Taylor. No entanto, não há consenso quanto à miscibilidade das soluções. Sun et al. [61] revelou que o "tempo característico da difusão da propagação da fronteira" entre duas soluções miscíveis é maior do que o do processo, pelo que não vai haver mistura das soluções. Yu et al. [50] comprovou a conclusão anterior e acrescentou que o uso do mesmo solvente ajuda a reduzir a tensão superficial entre as soluções e permite um desenvolvimento uniforme da fibra *core-sheath* graças à estabilidade dos cones de Taylor. Já no estudo de Liu e Xia [62] verificou-se que a mistura entre as duas soluções miscíveis ocorre durante o processo. Usaram então duas soluções imiscíveis e obtiveram fibras ocas ao retirarem a parte interna por imersão em octano. Ao substituírem a solução interna por uma miscível não se obteve uma fibra oca após a remoção do interior por calcinação a temperatura elevada. Usando apenas solventes miscíveis (e polímeros imiscíveis), obtiveram uma estrutura porosa depois da remoção interna por calcinação. A produção de fibras *core-sheath* é conseguida com o uso de solventes miscíveis ou com os mesmos solventes em ambas as soluções interna e externa.

### **Pressão do vapor do solvente**

O solvente usado, sobretudo no interior, pode ter uma grande influência na estrutura *core-sheath*. O uso de solventes com uma pressão de vapor elevada evaporam rapidamente e dão origem a uma estrutura interna irregular (*core* com fronteira não cilíndrica), figura 1.13, devido à produção de cones de Taylor instáveis e de múltiplos jactos.

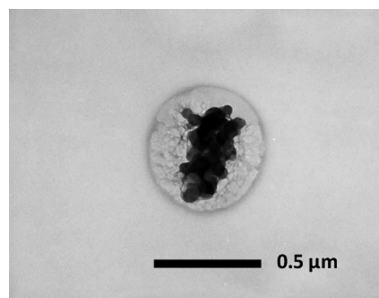


Figura 1.13: Imagem TEM: secção transversal na nanofibra *core-sheath* com colapso no interior (corante adicionado na solução interna para criar contraste)[49].

### **Condutividade**

Soluções com elevada condutividade transportam uma carga elevada, o que aumenta o estiramento do jacto devido à repulsão do excesso de carga, e produz fibras de pequeno diâmetro.

A diferença de condutividade das soluções pode afectar a formação da fibra. Uma elevada condutividade da solução interna causa descontinuidade na estrutura *core-sheath*, enquanto uma elevada condutividade da solução de revestimento não impede a formação desta estrutura, mas pode resultar num maior cisalhamento do material interno, formando uma camada interna mais fina. Também líquidos não condutores ou de baixa condutividade podem ser usados como solução interna para serem envoltos por um revestimento de elevada condutividade.

Na tabela 1.4 está representado o sumário dos principais requisitos das soluções a co-electrofiar para se obter uma fibra *core-sheath*.

Tabela 1.4: Requisitos das soluções poliméricas a co-electrofiar [49].

Parâmetros das soluções
Solução externa capaz de ser fiada
Elevada viscosidade da solução externa
Baixa tensão superficial entre as soluções
Uso de solventes de baixa pressão de vapor
Elevada condutividade da solução externa

## Parâmetros do Processo

### Tensão aplicada

Li e Xia [62] mostraram que os diâmetros interno e externo da fibra diminuem com o aumento do campo eléctrico. Existe uma pequena gama crítica de tensão aplicada que permite a formação do cone de Taylor estável, figura 1.14 B, que varia com o tipo de polímero usado. Uma tensão abaixo da gama causa o gotejamento das soluções seguido de um jacto intermitente da solução de revestimento com uma pequena incorporação da interna, figura 1.14 A. Já quando a tensão está acima da gama, o cone de Taylor diminui e os jactos tendem a desagregar-se nos capilares, resultando então em jactos separados das soluções interna e externa, não se formando fibras de estrutura *core-sheath*, figura 1.14 C. No estudo de Moghe et al.[49], a gama foi tão pequena quanto 1kV e a distância entre os capilares e o colector de 15 cm.

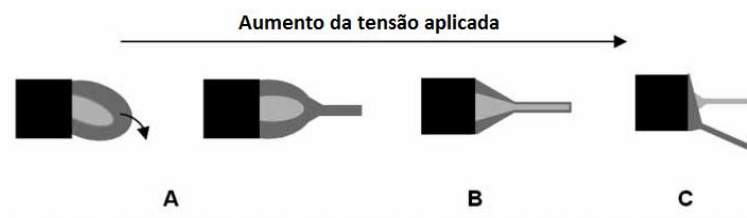


Figura 1.14: Dependência da tensão aplicada na formação da fibra coaxial: A) Tensão subcrítica; B) Tensão crítica; C) Tensão supercrítica. Adaptado de [49].

### Caudal das soluções

O caudal controla directamente as dimensões das camadas interna e externa na electrofiação coaxial, pelo que se deve ter atenção à diferença dos caudais das soluções. Se o caudal da solução interna for demasiado baixo, a quantidade de solução é insuficiente para a sua incorporação. Caso contrário, o seu cone de Taylor aumenta de tal forma que a solução externa não é suficiente para a encapsular. Logo, o caudal interno dever ser inferior ao externo [49].



## Capítulo 2

# Materiais e Métodos

Este capítulo apresenta os materiais e os métodos usados para preparar e caracterizar as AgNPs e as matrizes de fibras de PCL que as incorporam. São ainda apresentados os materiais e métodos usados nos testes de citotoxicidade efectuados às matrizes de fibras.

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Síntese das nanopartículas de prata

Para a produção das AgNPs, utilizou-se uma solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ , Panreac:  $M=169,87 \text{ g mol}^{-1}$ ) em água destilada, em dimetilformamida (DMF, Carlo Erba Reagents:  $\rho=0,949\text{--}0,952 \text{ kg mL}^{-1}$ ) e polivinilpirrolidona (PVP, Sigma-Aldrich:  $M=1300 \text{ kg mol}^{-1}$ ).

#### 2.1.2 Produção das matrizes de nanofibras

As fibras foram preparadas a partir de soluções onde se sintetizaram as AgNPs e de soluções de policaprolactona (PCL, Sigma-Aldrich:  $M= 70\text{--}90 \text{ kg mol}^{-1}$ ). Como solventes do PCL foram utilizados DMF e clorofórmio (Carlo Erba Reagents:  $\rho= 1,479\text{--}1,483 \text{ kg mL}^{-1}$ ). A algumas soluções de PCL foi adicionado cloreto de lítio ( $\text{LiCl}$ , Hygroscopic lithium chloride anhydrous, Fluka). A escolha do DMF como solvente da solução precursora das AgNPs permite usar a mistura desta solução com a solução de PCL no processo de electrofiação simples.

#### 2.1.3 Cultura celular

Para a realização dos testes de citotoxicidade, efectuou-se culturas de células *Vero* (linha imortalizada obtida a partir de células epiteliais de rim do macaco verde africano) em placas de 96 poços (96-well plates, Sarstedt, Germany) em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*, Sigma-Aldrich D5030). A cultura celular foi mantida numa incubadora ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , SANYO  $\text{CO}_2$  incubator, Model HCO-19AIC (UV)). Para a contagem celular utilizou-se o corante azul de tripano (Trypan blue solution 0,4%, Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>TM</sup>). A resazurina (Alfa Aesar, USA), numa concentração de 0,2 mg/mL em PBS, foi utilizada para os testes colorimétricos, cujas absorvâncias foram medidas no leitor de microplacas (Biotek ELX 800 UV). Ao controlo positivo foi adicionado

dimetilsulfóxido (DMSO,  $M = 78,13 \text{ g mol}^{-1}$ , MERCK-Schurardt).

Para a preparação dos meios condicionados adicionou-se fungicida (Fungizone<sup>®</sup> Antimycotic, Gibco<sup>®</sup>, amphotericin B  $250 \mu\text{g/mL}$ , Life Technologies).

## 2.2 Métodos

Neste trabalho, todas as concentrações estão indicadas como a razão percentual da massa da parte para a massa total (m/m), excepto se de outra forma indicado.

### 2.2.1 Síntese de nanopartículas de prata

As soluções precursoras das AgNPs foram preparadas a partir de:

- Uma solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  com uma concentração de  $200 \text{ mg mL}^{-1}$ ;
- Uma solução de PVP a 15% em DMF, colocada em agitação magnética durante 12 horas, de modo a garantir que o polímero foi totalmente dissolvido.

A solução de  $\text{AgNO}_3$  (que contém os iões  $\text{Ag}^+$ ) foi adicionada à solução de PVP por forma a obter misturas com duas proporções mássicas diferentes de PVP: $\text{AgNO}_3$ , nomeadamente 100:1 e 200:1. As misturas foram agitadas e os frascos com as soluções finais guardados, embrulhados em folha de alumínio, num ambiente ao abrigo da luz. A tabela 2.1 apresenta as quantidades usadas na preparação de cada solução bem como o símbolo que será usado para as designar.

Tabela 2.1: Composição das soluções preparadas para a produção de AgNPs.

Designação da Solução	PVP (g)	DMF (g)	Solução de $\text{AgNO}_3$ ( $\mu\text{L}$ )
PVP15_100	1,5	8,5	75
PVP15_200	1,5	8,5	37,5

Nestas soluções o DMF é o agente redutor dos iões  $\text{Ag}^+$  e o PVP controla o estado de agregação da prata reduzida.

As soluções precursoras foram colocadas em células usadas para espectrofotometria, com 1 cm de percurso óptico e de 4 faces de quartzo, e depois irradiadas com radiação de 254 nm num irradiador UV (UVP, CL-1000 ultraviolet crosslinker, Cellgro, equipado com lâmpadas de mercúrio). A irradiação processou-se por períodos de 30 minutos, separados por pausas de 10 minutos para homogeneizar e arrefecer a solução. O processo de formação das partículas na solução foi sendo monitorizado ao longo do tempo por espectrofotometria de UV-vis.

### 2.2.2 Produção das matrizes de nanofibras

As nanopartículas foram incorporadas em matrizes de nanofibras de PCL produzidas por electrofiação. Foram considerados dois processos de incorporação:

- Electrofiação simples para produção de nanofibras à base de PCL em que AgNPs e PVP se distribuem por todo o volume da fibra;

- Electrofiação coaxial para produção de nanofibras com um *core* de PVP e AgNPs encapsulado por PCL.

O clorofórmio é um bom solvente para o PCL e é fácil electrofiar este polímero a partir de soluções em clorofórmio [53]. Por isso este solvente foi escolhido para produzir as soluções a fiar.

### Electrofiação Simples

No processo de electrofiação simples (ES) foi electrofiada uma mistura de uma solução de PVP onde foram sintetizadas as AgNPs com uma solução de PCL dissolvido em clorofórmio. De facto, a utilização do DMF como solvente na solução de PVP com  $\text{AgNO}_3$  permite esta mistura já que o DMF é miscível com o clorofórmio e também é solvente do PCL.

Antes de seleccionar a composição final da mistura a utilizar foram feitos alguns testes. Assim, foram preparadas soluções de PCL a 10% e a 15% em clorofórmio. As soluções também permaneceram 12 horas em agitação magnética, para garantir a completa dissolução do polímero. Considerou-se depois a mistura destas soluções com a solução de PVP a 15% já com as AgNPs sintetizadas, em diferentes proporções mássicas, como se mostra na tabela 2.2.

Tabela 2.2: Composição das soluções consideradas para o processo de electrofiação simples.

Soluções misturadas			Solução final				
Solução de PVP	S_PVP	Solução de PCL	Designação	Proporção	% PVP	% PCL	Proporção
% PVP	Pro- porção de PVP: AgNO <sub>3</sub>	% PCL		S_PVP: S_PCL			polímeros: AgNO <sub>3</sub>
15	200:1	10	S1	1:3	3,75	7,5	600:1
15	200:1	15	S2	1:3	3,75	11,5	800:1
15	200:1	15	S3	1:2	5	10	600:1
15	100:1	15	S4	1:2	5	10	300:1
15	100:1	15	S5	1:3	3,75	11,25	400:1
15	100:1	10	S6	1:3	3,75	7,5	300:1

No processo de ES usou-se a montagem experimental ilustrada na figura 2.1. Esta é composta por uma bomba infusora (modelo Fusion100 da CHEMYX) para controlar o caudal de ejeção da solução a fiar (esta bomba permite também controlar o tempo de deposição), uma seringa (INJEKT-F, 5 mL, B|BRAUN) acoplada a uma agulha de calibre 23 (diâmetro interno de 0,33 mm), uma fonte de alta tensão (GREAT, 0-30 kV) e um colector metálico ligado à terra. Este colector está acoplado a um sistema com dois motores que permitem comunicar-lhe movimentos de translação e rotação por forma a espalhar e uniformizar a deposição das fibras colectadas.

Como ocorre separação de fases na mistura a fiar devida à imiscibilidade dos polímeros, foi colocado no interior da seringa um pequeno magneto que ao girar mantém a mistura uniforme. O movimento deste magneto é garantido pelo movimento de um outro magneto suspenso no eixo de um motor e que é colocado nas proximidades do primeiro. O motor utilizado é DC e está ligado a uma fonte de alimentação (ISO-TECH, IPS 303DD) de forma a controlar a velocidade de rotação do magneto

suspenso.

Antes da utilização do sistema de fiação, coloca-se cuidadosamente a mistura na seringa por forma a que não fiquem bolhas no seu interior, prende-se à agulha um crocodilo fixo na extremidade do cabo da fonte para aplicação da tensão e reveste-se o colector com folha de alumínio. Os parâmetros do processo são então ajustados e os ambientais monitorizados, por um aparelho que lê a humidade relativa (H. R.) e a temperatura (Testo limited, Alarm-Hygrometer testo 602-H2).

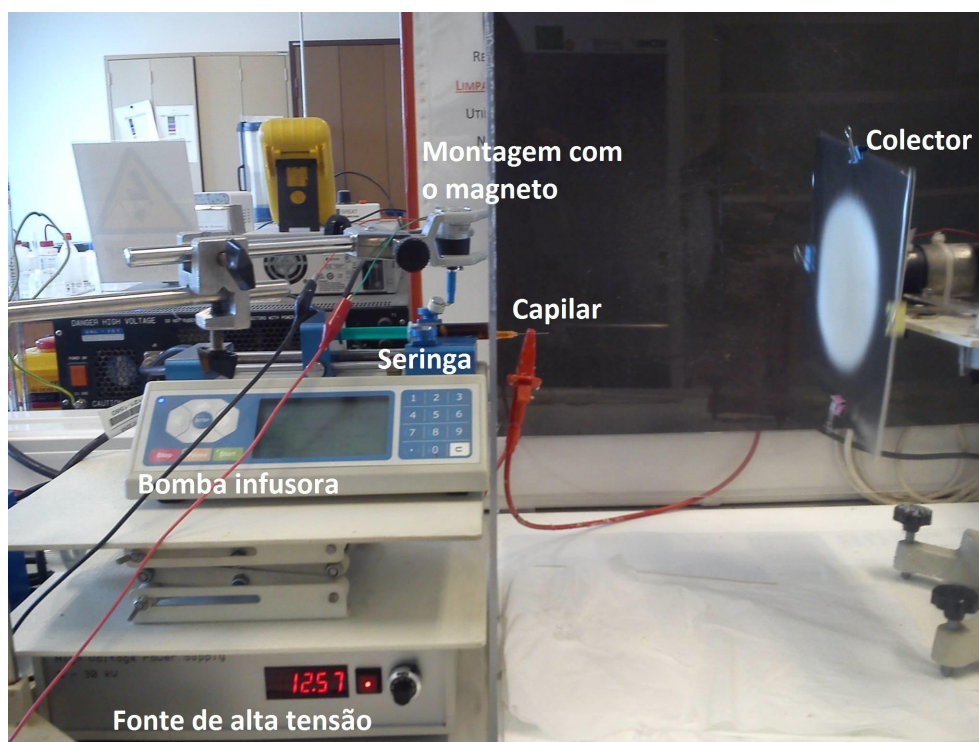


Figura 2.1: Sistema de electrofiação simples utilizado.

Tendo em conta a composição das soluções como a estabilidade do processo de fiação seleccionou-se a mistura S6 para produção das matrizes de fibras por ES. Estas matrizes foram produzidas usando os parâmetros do processo indicados na tabela 2.3.

Tabela 2.3: Parâmetros de electrofiação utilizados na produção de matrizes a partir da solução S6.

Caudal (mL/h)	Tensão (kV)	Distância (cm)	Capilar (G)	Temperatura (°C)	H. R. (%)
0,3	12	20	23	19-22	39-67

### Processo de Electrofiação Coaxial

Na electrofiação coaxial (EC), são utilizadas duas soluções: uma é injectada através de um capilar cilíndrico (solução interna) e a outra entre este capilar e outro de maior diâmetro (solução externa). Como solução interna foi usada a solução PVP15.100 depois de nela terem sido sintetizadas as AgNPs. A solução externa foi obtida dissolvendo PCL a 12% numa mistura de clorofórmio e DMF. Ao DMF foi previamente adicionado LiCl numa concentração de 10 mg/mL, assim como também se utilizou DMF sem este sal. Os dois solventes foram misturados numa razão de clorofórmio:DMF de 8:2.



Esta composição para a solução externa (designada por PCL12.DMF2.Clorof8) foi estabelecida depois de efectuados ensaios de fiação coaxial onde foram consideradas diversas constituições do solvente e concentrações de PCL.

Para o processo de EC usou-se a montagem na figura 2.2. Nesta montagem as soluções interna e externa são colocadas cada uma numa seringa e os respectivos caudais são controlados por duas bombas infusoras (Seringapump, modelo NE-300). Cada seringa tem uma agulha acoplada na sua extremidade: calibre 18 (diâmetro interno de 0,956 mm) na correspondente à solução externa e 22 (diâmetro interno 0,508 mm) na correspondente à solução interna. Estes capilares estão inseridos em tubos de teflon, de calibres 17 e 22, respectivamente, que conduzem as soluções até ao injector coaxial. Como a solução interna é muito condutora, houve a necessidade de reforçar o isolamento eléctrico do tubo de teflon de calibre 22 inserindo-o noutro de maior diâmetro (para este efeito utilizou-se um de calibre 17). O isolamento eléctrico da seringa com a solução interna também foi reforçado, envolvendo-a também numa folha de teflon.

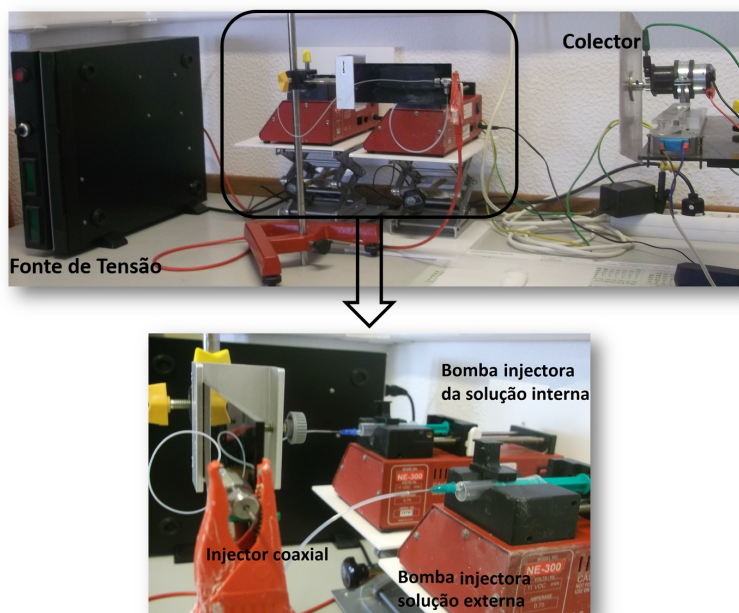


Figura 2.2: Montagem experimental usada na electrofiação coaxial.

O injector coaxial está montado num T metálico (*Union Tee*) com três furos que estabelecem a comunicação entre o seu interior e o exterior. A figura 2.3 mostra um esquema da montagem. Em cada um dos furos do T uma rosca e uma peça (*ferrule*, que também delimita o volume interno do T) fixam um capilar (ver figura):

- O capilar 1 atravessa os dois furos na parte superior do T estando fixo no furo da extremidade esquerda. É também nesta extremidade que o capilar enfia no tubo de teflon que transporta a solução interna.
- O capilar 2, de diâmetro maior do capilar 1 e mais curto que este, é fixo no furo da extremidade direita do T coaxialmente com o capilar 1. É pelo espaço entre o capilar 1 (capilar interno do injector) e o capilar 2 (capilar externo do injector) que será ejectada a solução externa.
- O capilar 3 está fixo no furo inferior do T e enfia no tubo de teflon que transporta a solução externa. A solução externa é assim introduzida no volume interno do T e penetra no espaço

entre os capilares externo e interno do injector por onde é injectada.

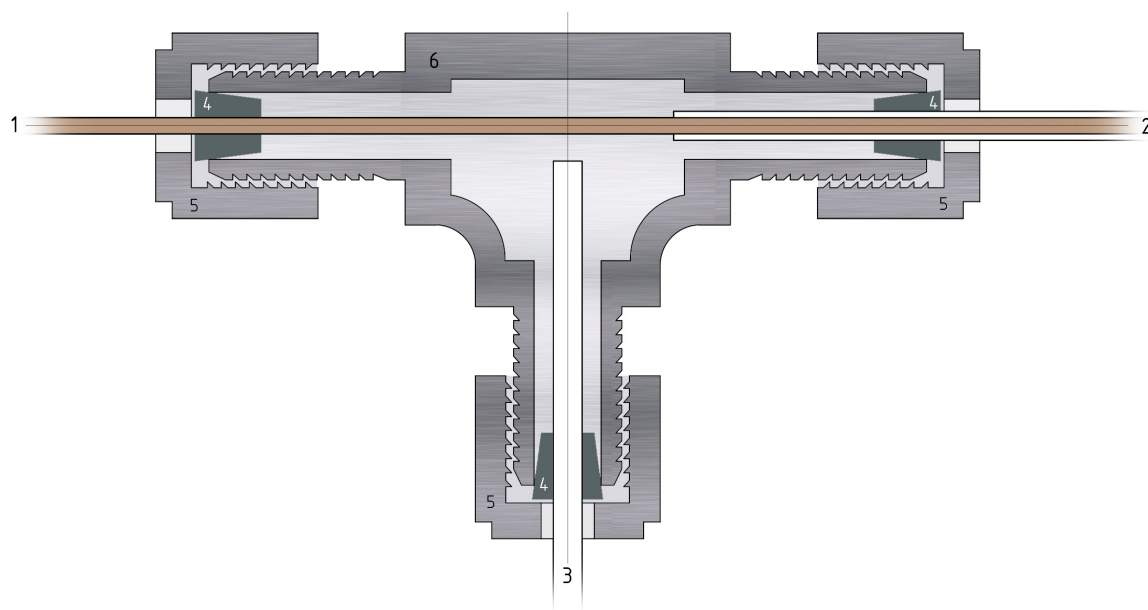


Figura 2.3: Ilustração do esquemático da montagem do injector coaxial em corte. 1) Capilar interno. 2) Injector externo. 3) Capilar de alimentação da solução externa. 4) Ferrule. 5) Rosca. 6) Ligação metálica em forma de T.

Na figura 2.4 está representada a secção recta do injector coaxial. Para que se consiga produzir fibras coaxiais é muito importante manter os capilares interno e externo bem alinhados partilhando o mesmo eixo. Como se pode ver na figura 2.3, a extremidade do capilar interno está ligeiramente recuada relativamente à extremidade do capilar externo para melhorar o encapsulamento.

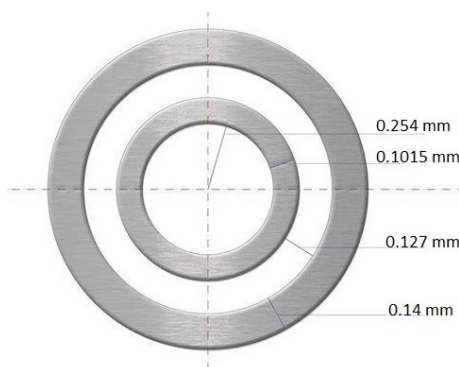


Figura 2.4: Representação da secção recta do injector coaxial composto pelos capilares interno e externo. No esquema estão indicadas as dimensões dos capilares bem como dos espaços por onde fluem as soluções.

As restantes partes da montagem usada para a EC são semelhantes às da montagem da ES como se mostra na figura 2.2. A tensão é aplicada ao injector pelo crocodilo na extremidade do cabo ligado a uma fonte de alta tensão (0-40 kV, GREAT), pelo que ambas as soluções estão polarizadas à mesma tensão.

Para estabelecer os parâmetros da solução e do processo foram efectuados vários ensaios durante os

quais se monitorizaram os parâmetros ambientais. As matrizes de fibras coaxiais foram produzidas utilizando os parâmetros registados na tabela 2.4.

Tabela 2.4: Parâmetros de electrofiação coaxial utilizando como solução interna PVP15\_100 e como externa PCL12.DMF2\_Clorof8.

Caudal interno (mL/h)	Caudal externo (mL/h)	Tensão (kV)	Distância (cm)	Capilar interno (G)	Capilar externo (G)	Temperatura (°C)	H. R. (%)
0,26	0,5	17-19	20-23	22	18	21-24	31-44

### 2.2.3 Propriedades das soluções

De entre as propriedades das soluções, revelou-se útil durante o trabalho avaliar quantitativamente a condutividade e a densidade de algumas delas.

#### Condutividade

A condutividade de uma solução é uma medida da facilidade com que a carga é transportada através da mesma.

Nos processos de electrofiação, a condutividade das soluções usadas é um parâmetro muito importante. A incorporação de compostos metálicos ou de sais solúveis numa solução altera significativamente a sua condutividade.

Para avaliar o efeito dos solventes e da presença de prata nas soluções, foram efectuadas medidas de condutividade com um condutímetro da *Hanna instruments* (HI 4521). Para calibrar o aparelho utilizaram-se as soluções de calibração indicadas na tabela 2.5 (*Hanna instruments*). A calibração foi efectuada à temperatura a que foram efectuadas as medidas (23 °C).

Tabela 2.5: Valores das condutividades usadas na calibração do condutímetro.

Solução de Calibração	Condutividade a 25 °C ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Condutividade a 23 °C ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
HI 7031	1413	1346
HI 7033	84	81,26
HI 7039	5000	4794

#### Densidade

A densidade relaciona a massa com o volume por ela ocupado.

Para avaliar a composição das fibras coaxiais a partir da composição e dos caudais das soluções fiadas coaxialmente, foi necessário determinar os valores das densidades das soluções interna e externa. Para tal usou-se um picnómetro de volume  $V=5$  mL (Normax, Portugal). Numa balança (Analytical Balance, RADWAG® XA 82/220/2X, valor mínimo de 1 mg), foram determinadas: a massa  $m$  do picnómetro vazio e a massa  $M$  do picnómetro com a solução. A densidade foi calculada de acordo

com a equação 2.1.

$$\rho = \frac{M - m}{V} \quad (2.1)$$

#### 2.2.4 Espectrofotometria de UV-vis

Uma forma de detectar a presença de AgNPs numa solução é pela sua análise por espectrofotometria de UV-vis monitorizando a presença da sua ressonância plasmónica (SPR) por volta dos 400 nm. Neste trabalho esta monitorização foi feita quer com as soluções onde foram sintetizadas as nanopartículas quer com os meios para os quais se estudou a sua libertação a partir das matrizes. Para se analisarem espectralmente as soluções usou-se o espectrofotómetro (spectrometer, scansource Abs, scansci). O espectrofotómetro possui duas lâmpadas que cobrem regiões diferentes de comprimentos de onda: uma cobre essencialmente a região ultravioleta e a outra a região do visível. Operou-se o espectrofotómetro ligando apenas a lâmpada de ultravioleta o que permite obter uma melhor resolução do espectro na região de interesse. Para a aquisição de dados usou-se o *software SpectraScan*, começando por definir o nível de fundo (*dark*) com as lâmpadas desligadas e depois, ligando a lâmpada, a referência de medição (branco). Estes valores foram estabelecidos em cada análise. Existem parâmetros da aquisição de dados que devem ser definidos: o valor de *integration time* que define o tempo de aquisição do detector e o *average* que define o número de vezes que são feitas aquisições com a duração estabelecida pelo *integration time*, e com base nas quais são calculados valores médios. Estes parâmetros foram ajustados por forma a melhorar a resolução do espectro de absorvância.

O *software* permite visualizar gráficos de contagens e de absorvância em função do comprimento de onda e fornece tabelas com os valores das contagens médias para os vários comprimentos de onda efectuadas pelo detector durante o período de *integration time* para a amostra (T0), para o *dark* (T1) e para a referência (T2), o que permite a reconstrução dos gráficos em programas adequados para esse fim. Estas tabelas foram usadas para construir com o programa *Kaleidagraph* (*Synergy Software*, Versão 4.03) os gráficos de absorvância que são apresentados no capítulo 3. Estes gráficos foram reconstruídos a partir das tabelas usando a definição de acordo com a equação 2.2.

$$A(\lambda) = -\log \frac{T0(\lambda) - T1(\lambda)}{T2(\lambda) - T1(\lambda)} \quad (2.2)$$

As soluções a analisar foram colocadas em células de quartzo de 1 cm ou de 1 mm de percurso óptico. Sempre que o espectro de absorvância obtido na célula de 1 mm saturava na região de interesse a analisar devido ao baixo número de contagens detectado após atenuação do feixe pela amostra, procedeu-se à sua conveniente diluição.

#### 2.2.5 Avaliação da libertação de nanopartículas de prata a partir de matrizes

Para detectar a presença de AgNPs nos lixiviados das matrizes (meios onde as matrizes permanecem durante algum tempo) recorreu-se à sua análise pela técnica de espectrofotometria de UV-vis. Para cada ensaio, foi considerada uma amostra de matriz que colocada num volume de água destilada numa razão de massa de matriz para volume de água de 10 mg/mL. Esta razão permite imergir totalmente a amostra da matriz na água. As amostras foram mantidas em água sob agitação num agitador

orbital (Digital Orbital Shaker, SCILOGEX SK-330-Pro).

Para cada tipo de matriz foram efectuadas três deposições e a partir de cada deposição foram obtidas várias amostras. Estas amostras permaneceram em água por diferentes períodos de tempo por forma a analisar os lixiviados em função do tempo de imersão da amostra em água- tempo de libertação das AgNPs para a água. Os tempos seleccionados foram 10, 20, 30, 40, 60, 120, 240, 360, 720 e 1440 minutos.

A análise dos lixiviados por espectrofotometria de UV-vis foi feita em células com duas faces de quartzo e com 1 cm de percurso óptico. Antes de cada medição, foram estabelecidos o zero e a referência (com a célula com água destilada).

### 2.2.6 Avaliação microscópica

#### Microscopia óptica

Utilizando um microscópio óptico, (Nikon Eclipse, LV100), foi possível fazer uma primeira avaliação das fibras produzidas, de forma a aferir acerca dos parâmetros de electrofiação.

#### Microscopia electrónica de varrimento- SEM

A microscopia electrónica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*), permite analisar a topografia das matrizes com maior detalhe. Esta técnica consiste em varrer a amostra com feixe focado de electrões, altamente energéticos (com um baixo comprimento de onda associado). A imagem é obtida a partir de um sinal que tem origem na interação destes electrões com a amostra. O SEM permite observações com melhor resolução (da ordem do nm) do que o microscópio óptico devido ao menor comprimento de onda do feixe incidente em relação ao da luz visível.

As amostras observadas em SEM foram fixas num disco metálico com fita condutora de carbono. Foram depois analisadas num SEM de bancada (Hitachi, HM3030Plus). A amostra é colocada numa zona de observação onde, apesar da pressão ser mantida baixa por uma bomba de vácuo, existe ar cujas moléculas, ionizadas pelos electrões do feixe, garantem que a amostra descarregue ainda que não seja condutora. Assim, não foi necessário proceder ao seu revestimento com material condutor.

#### Microscopia electrónica de transmissão- TEM

Para avaliar o encapsulamento das AgNPs na camada interna das fibras electrofiadas utilizando o injector coaxial, recorreu-se à microscopia electrónica de transmissão (TEM, do inglês *Transmission Electron Microscopy*), uma vez que o SEM só permite visualizar a superfície das fibras, e não o seu interior. Esta técnica também permite aferir acerca do tamanho e da forma das AgNPs produzidas. O princípio de funcionamento de um TEM baseia-se na construção de uma imagem a partir da detecção de electrões que atravessam uma amostra. Assim, a amostra tem de ser fina de forma a permitir a passagem dos electrões incidentes. Para a preparação das amostras, foram utilizadas grelhas de cobre e grelhas revestidas com *formvar* (fino filme polimérico), com malha 300 (ver figura 2.5). Foram analisadas fibras coaxiais, fibras obtidas por ES das soluções S6 e de PVP15\_100 e filmes finos produzidos a partir desta última solução (solução onde foram sintetizadas as AgNPs). Para a recolha das amostras de fibras, os sistemas de electrofiação foram montados na vertical, como se mostra na figura 2.6, por forma a recolher fibras nos dois tipos de grelhas assentes na superfície horizontal

do colector. Procedeu-se assim à fiação durante um curto período de tempo. Para produzir o filme diluiu-se a solução de PVP15.100 em DMF (num factor de 8) e em etanol até a diluição apresentar uma tonalidade amarela clara. Também se analisaram as AgNPs, encapsuladas em nanofibras coaxiais, que foram libertadas para a água durante o tempo de imersão de 120 minutos. Uma gota de cada solução foi depois depositada numa grelha de cobre e noutra revestida por *formvar*, respectivamente. As análises de TEM foram efectuadas no aparelho de marca Hitachi (modelo H-8100 II).

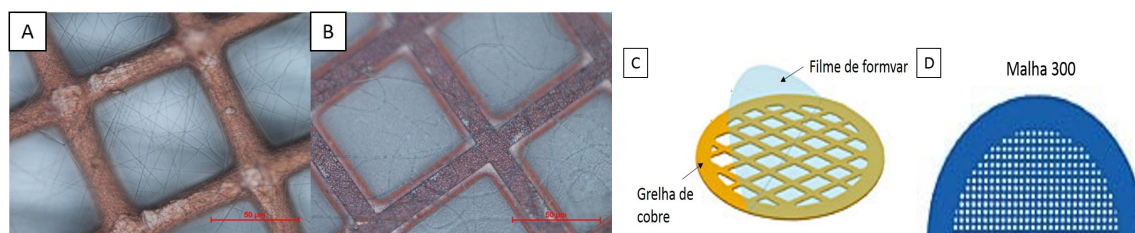


Figura 2.5: Imagens obtidas por microscopia óptica utilizadas para depositar as amostras a analisar por TEM: A) Grelha de cobre, numa resolução de 500  $\mu\text{m}$ . B) Grelha de cobre com filme de *formvar*, numa resolução de 500  $\mu\text{m}$ . Imagens que ilustram a composição e forma das grelhas, adaptado de [63]: C) Estrutura da grelha de cobre revestida de *formvar* D) com uma malha de 300.

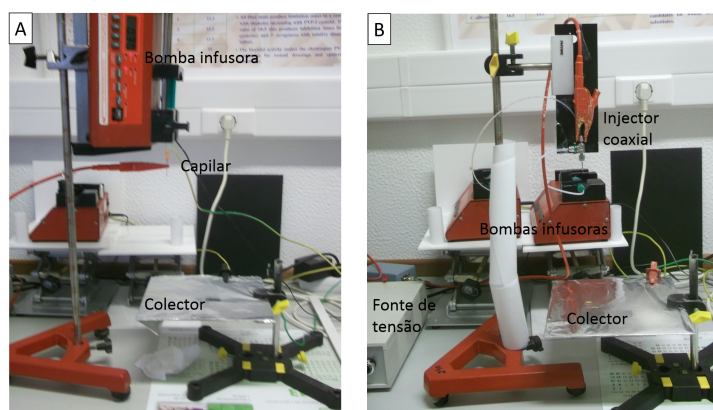


Figura 2.6: Montagens experimentais verticais de electrofiação. A) Electrofiação simples. B) Electrofiação coaxial.

## Análise de imagens

A avaliação quer do diâmetro das fibras quer do tamanho das AgNPs foi efectuado a partir da análise das imagens de SEM e TEM, respectivamente, com recurso ao software *ImageJ* (*National Institutes of Health, USA*, versão 1.48).

Os diâmetros das fibras foram determinados a partir de 70 amostras; para o diâmetro das AgNPs encapsuladas nas fibras a amostragem foi de cerca de 80 e de 155 para os filmes. Os valores obtidos foram representados em histogramas, tal como, a partir dos quais, se calculou a média e o desvio padrão da média dos diâmetros.

## 2.3 Teste de citotoxicidade

Uma vez que as matrizes produzidas com AgNPs encapsuladas se destinam ao desenvolvimento de substitutos de pele, é crucial a avaliação de potenciais efeitos tóxicos em células animais. Para efectuar esta avaliação, realizaram-se culturas de células *Vero*, uma linha imortalizada obtida a partir de células epiteliais de rim do macaco verde africano e efectuaram-se *in vitro* testes de citotoxicidade pelo método de extracto. Este método consiste na obtenção de um extracto da amostra a avaliar por colocação da mesma em meio de cultura. Este meio condicionado pelo extracto é depois usado para substituir o meio de cultura de células semeadas em condições normais e, posteriormente, avalia-se a viabilidade destas.

O procedimento geral seguido nos testes de citotoxicidade foi o seguinte:

- As células foram semeadas numa placa de 96 poços, com uma densidade celular adequada e foram deixadas 24 horas em cultura numa incubadora (SANYO, Model HCO-19AIC (UV)) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.
- Colocou-se a matriz no meio de cultura habitualmente usado para as células *Vero* (DMEM, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) ao qual se adicionou 1% V/V de antifúngico (*Fungizone*). O meio foi previamente aquecido em banho de água a 37°C (Mermmet) num *falcon* e foi usada uma quantidade de matriz de 15 ou 30 mg/mL em meio (consoante os ensaios). O meio com a matriz foi então mantido 24 horas no interior de uma estufa (J.P. Selecta, s.a.) e em agitação devida a um agitador orbital.
- A partir do meio condicionado pela amostra (obtido após as 24 horas de incubação) foram feitas várias diluições por forma a obter meios condicionados mais diluídos. O meio de cultura de cada poço da placa com células (incubadas 24 horas) foi substituído por meio condicionado nas diferentes concentrações. Tomaram-se 5 réplicas por condição. Foram ainda preparados controlos negativos e positivos, mudando apenas o meio de cultura e adicionando 20% V/V de dimetilsulfóxido (DMSO), respectivamente. As células foram incubadas nestas condições por mais 24 horas.
- Para avaliar a viabilidade celular adicionou-se 10% V/V de resazurina ao meio de cultura, e colocou-se esta mistura em cada poço após a remoção do meio condicionado. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) funciona como um indicador do número de células viáveis: na presença de células vivas, a resazurina (composto azul, com um pico de absorvância a cerca de 600 nm) é reduzida, dando origem a resorufina (composto vermelho, com um pico de absorvância a cerca de 570 nm); a conversão é proporcional ao número de células metabolicamente activas. Assim, após 24 horas de incubação das células nos meios condicionados, substituiu-se o meio em cada poço pela mistura do meio de cultura com a resazurina, a fim de avaliar a viabilidade celular. Foram ainda preparados controlos de meio. A placa foi colocada na incubadora durante 2 horas ao fim das quais se mediram as absorvâncias dos vários poços num leitor de microplacas (Biotek ELX 800 UV).

Foram realizados 4 ensaios dos testes de extracto considerando diferentes diluições do meio condicionado pela matriz (o que é equivalente a diferentes proporções de massa de matriz por mL de meio de cultura). Os dois últimos ensaios (em que se consideraram as mesmas condições) foram prolongados para as 48 e 72 horas. Os esquemas das placas utilizadas nos diferentes ensaios estão representados na figura 2.7 onde são indicadas as diferentes proporções de massa de matriz por mL de meio testadas.



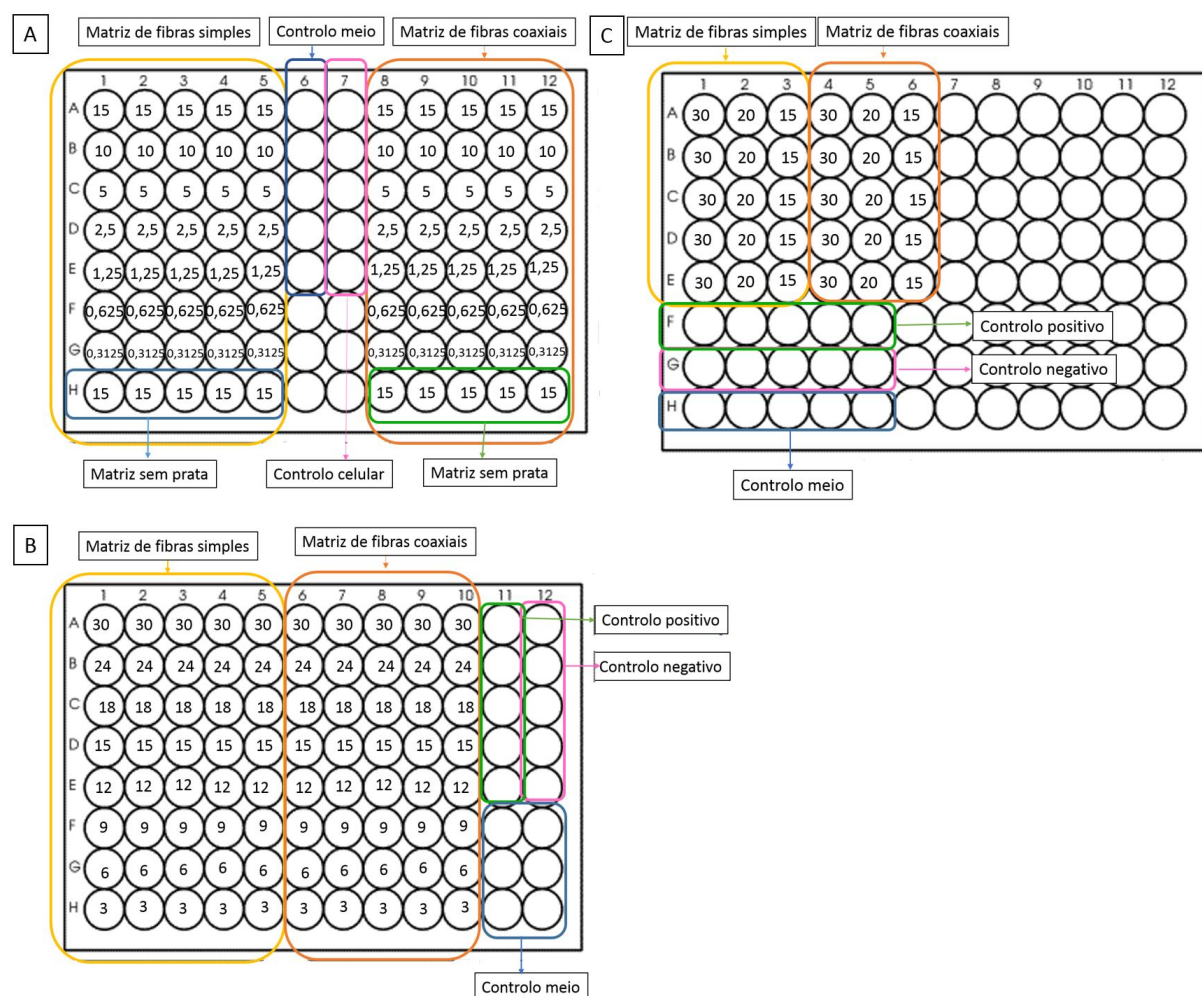


Figura 2.7: Ilustração do modo de preparação da placa de poços para os testes de citotoxicidade, para os vários ensaios realizados. Os valores apresentados correspondem à massa de matriz por volume de meio (mg/mL) testada. A) Ensaio I. B) Ensaio II. C) Ensaios III e IV.

Para além dos testes de extracto realizados com as matrizes simples e coaxial, também se procedeu ao teste da citotoxicidade do próprio sal. Para tal, preparam-se meios condicionados com diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  em meio de cultura (4, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5 e 0,25  $\mu\text{L}$ ), a partir de uma solução inicial em água ultra-pura (20 mg/mL). Este teste foi realizado para uma sementeira de 4000 células por poço para três tempos de contacto, 24, 48 e 72 horas, e para uma densidade de 8000 células por poço para 24 horas de contacto.

Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas numa câmara de fluxo laminar (ESCO Labculture, Classe II) e usando material estéril de modo a evitar contaminações.

O protocolo detalhado seguido para na cultura celular encontra-se no Apêndice A.



## Capítulo 3

# Resultados e discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o trabalho desenvolvido e que inclui: a síntese e caracterização das AgNPs em solução, a sua incorporação em matrizes fiadas por electrofição simples e coaxial e a caracterização destas matrizes, os estudos de libertação das AgNPs a partir das matrizes e a avaliação de potenciais efeitos citotóxicos.

### 3.1 Síntese e caracterização de nanopartículas de prata

As AgNPs foram sintetizadas a partir de soluções de  $\text{AgNO}_3$  como indicado no capítulo 2. Pretendia-se atingir os seguintes objectivos: maximizar a quantidade de partículas obtidas, obter partículas com dimensões da ordem da dezena dos nm, com uma distribuição de tamanhos relativamente estreita e estável. Na figura 3.1 apresenta-se como o espectro de UV-vis das soluções consideradas evolui ao longo do tempo de irradiação. Para obter estes espectros foram feitas pausas na irradiação das soluções colocadas em células de 4 faces de quartzo e com 1 cm de percurso óptico. Durante as pausas a solução foi agitada para proceder à sua homogeneização (já que o seu aspecto não era homogéneo) e uma pequena amostra foi transferida para uma célula de 1 mm a fim de proceder à sua análise espectrofotométrica (sem que ocorra extinção do feixe que chega ao detector). Assim, a avaliação espectrofotométrica da solução irradiada exigiu a sua diluição, pelo que as amostras a analisar passaram a ser diluídas de um factor de 4. Paralelamente irradiou-se, seguindo os mesmos tempos e processos de homogeneização, uma amostra da mesma solução sem nunca abrir a célula de quartzo onde estava colocada.

Analisando a figura 3.1, constata-se que, para ambas as soluções, a banda de SPR se torna mais estreita em função do tempo de irradiação, assim como o seu máximo aumenta. A solução PVP15\_100 foi diluída num factor de 4 e a PVP15\_200 num factor de 2.

Apesar da intensidade do pico revelar alterações aparentemente pouco significativas a partir dos 150 minutos de irradiação, verificou-se que os espectros das soluções irradiadas por este período variava ao longo do tempo posterior à irradiação- ao fim de um dia já era perceptível o aumento da intensidade do pico da SPR. Assim, aumentou-se o tempo de irradiação e estabeleceu-se que a irradiação seria levada a cabo por períodos de 30 minutos intercalados com pausas de 10 minutos para permitir a homogeneização da solução e, simultaneamente, o seu arrefecimento já que a solução aquece consideravelmente durante o tempo de irradiação. Na figura 3.2 mostra-se a evolução dos espectros das soluções irradiadas por períodos de tempo entre os 150 e 240 minutos.

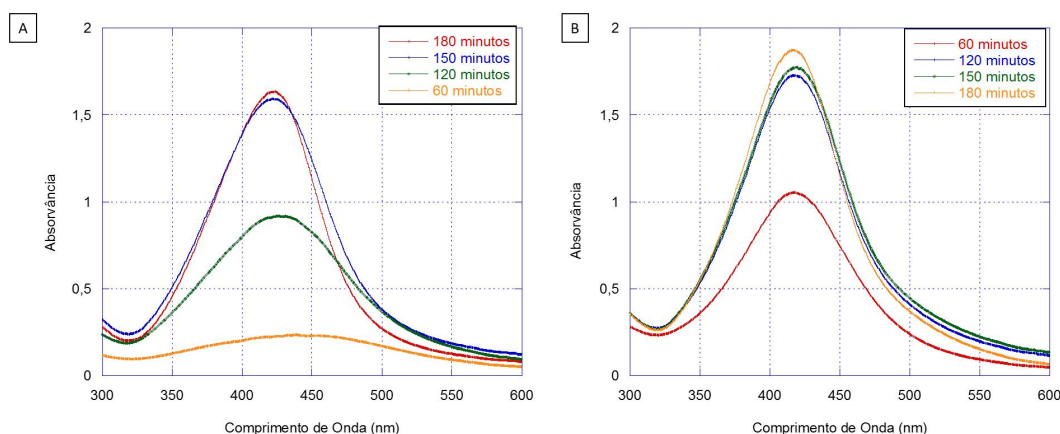


Figura 3.1: Espectros de UV-vis das soluções A) PVP15\_100 e B) PVP15\_200 (diluída num factor de 2) para os diferentes tempos de irradiação (indicados nos gráficos).

Como se pode verificar nos gráficos A, ao irradiar as soluções num total de 240 minutos o número de AgNPs tendem a estabilizar, presumivelmente devido a quase toda a prata ter sido reduzida e estar sob a forma de agregados estáveis. O aumento verificado na intensidade da SPR no gráfico correspondente à solução PVP15\_100 pode dever-se à evaporação do solvente ou desvio no factor de diluição. Os valores de absorvância para o mesmo tempo de irradiação são superiores na solução PVP15\_100 do que na solução PVP15\_200 como seria de esperar já que a primeira contém uma maior concentração de prata. As AgNPs obtidas após tempos de irradiação da ordem dos 210-240 minutos apresentam-se estáveis, uma vez que os espectros B não sofrem alterações significativas ao longo do tempo pós produção.

A posição da SPR por volta dos 420 nm nos gráficos da figura 3.2 indica que as partículas formadas serão na sua maioria esféricas com diâmetros da ordem dos poucos nm [64]. A largura da SPR relaciona-se com a dispersão dos tamanhos das AgNPs: comprimentos de onda maiores estão associados a partículas maiores e vice-versa.

Por razões que têm a ver com a constituição das fibras a electrofiar, tanto no que diz respeito à sua composição polimérica como à quantidade de prata que possuirão, optou-se por prosseguir o trabalho com a síntese das AgNPs na solução PVP15\_100. A figura 3.3 apresenta fotografias desta solução onde se pode observar a sua cor castanha e amarelo acastanhado quando diluída. Todas as soluções com AgNPs sintetizadas para serem usadas nas restantes partes do trabalho, foram monitorizadas espectrofotometricamente antes da sua utilização, tendo sido observados pequenos desvios relativamente aos espectros apresentados na figura 3.2.

Para avaliar até que ponto a irradiação das soluções promove uma formação eficiente e controlada de AgNPs na solução PVP15\_100, foi avaliada a formação de AgNPs na solução não irradiada. Assim a solução foi mantida num fraco e exposta à luz ambiente. Como se pode verificar na figura 3.4, o espectro, obtido numa célula de percurso óptico de 1 mm com a solução não diluída, duas semanas após a sua preparação, apresenta uma pequena intensidade da banda de SPR.

Também se expôs a solução de PVP15\_100 à luz ambiente, numa célula de quartzo (que, ao contrário do vidro do frasco, permite a passagem da radiação UV), durante cerca de 3 meses. Ao longo do tempo verificou-se que apresentou uma cor amarelada, depois acastanhada não homogênea (ver figura 3.5 A), tornando-se posteriormente esverdeada (figura 3.5 B) e com um depósito. Ao fim dos 3 meses, o espectro da solução, diluída por um factor de 8, apresenta (figura 3.5 C) uma banda

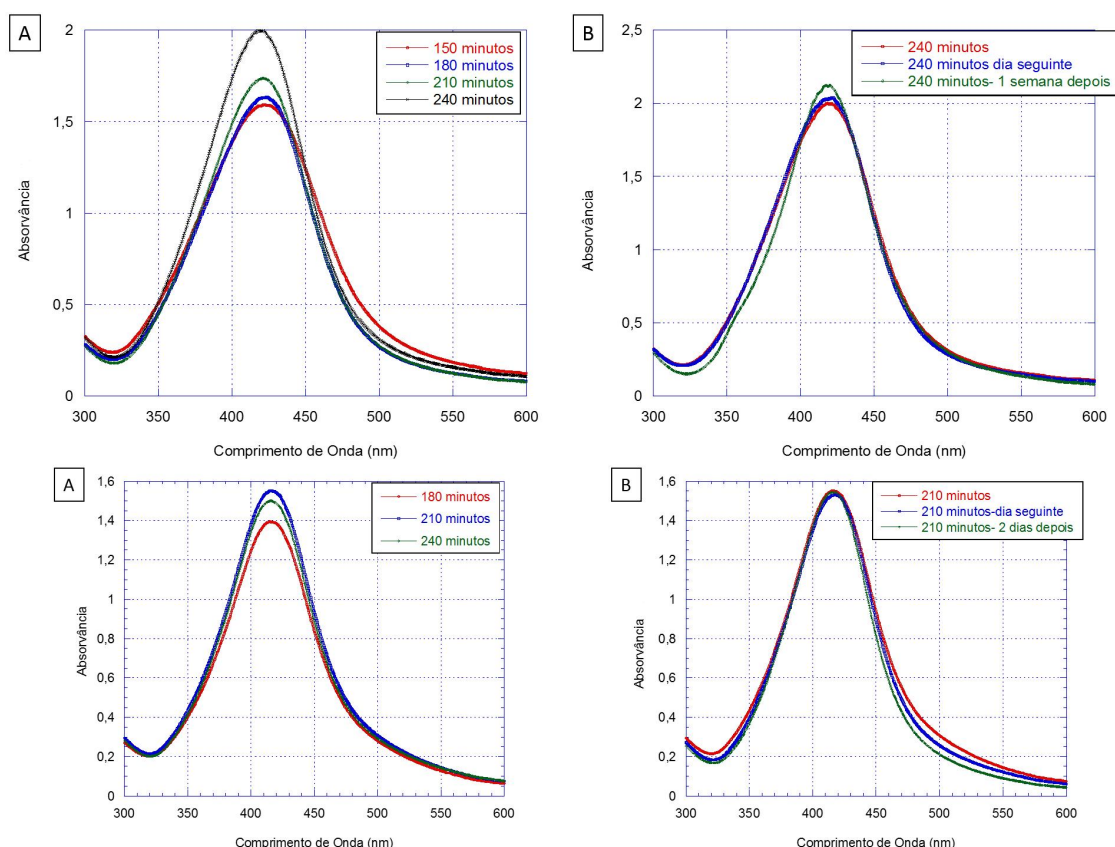


Figura 3.2: Espectros de UV-vis das soluções PVP15\_100 (na parte superior da figura) e PVP15\_200 (na parte inferior da figura) A) Espectros para diferentes tempos de irradiação das soluções (indicados nos gráficos). B) Espectros após a irradiação pelo período indicado e em dias posteriores à sua irradiação (indicados nos gráficos).

SPR centrada pelos 420 nm, mas menos intensidade e mais larga do que quando a solução irradiada no irradiador UV por 240 minutos. Estas características do espectro apontam para a presença de partículas de maiores dimensões.

Deste modo, conclui-se que o processo de irradiação por UV promove a rápida formação na solução PVP15\_100 de AgNPs de pequenas dimensões e com uma distribuição de tamanhos relativamente estreita.

As imagens obtidas por TEM do filme preparado a partir da solução PVP15\_100, diluída em DMF, são apresentados na figura 3.6 onde também se pode encontrar o espectro da solução diluída e o histograma correspondente às medições dos diâmetros das AgNPs observadas no filme. Pode-se comprovar que, de facto, as AgNPs apresentam uma forma esférica e que a grande parte possui um diâmetro no intervalo  $13,0 \pm 0,5$  nm. Existem algumas AgNPs com diâmetros na ordem dos 35 nm que podem corresponder a partículas que se formaram por aglomeração de partículas mais pequenas. De acordo com o espectro de absorvância, pode estabelecer-se uma relação entre a localização do máximo da banda SPR a 420 nm e o diâmetro médio das partículas de 13,0 nm.

As imagens de TEM do filme preparado a partir da solução PVP15\_100, bastante diluída em etanol, são apresentadas na figura 3.7. As partículas observadas neste filme são mais pequenas do que as da figura 3.6, na ordem dos  $8,8 \pm 0,3$  nm. A diferença encontrada pode dever-se a que a rápida evaporação do etanol não permita a agregação de partículas durante a formação do filme.

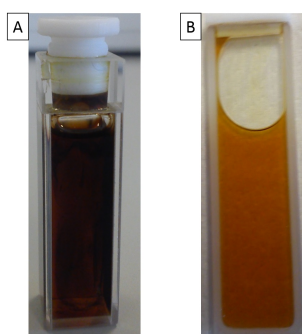


Figura 3.3: Células de quartzo com a solução PVP15\_100 A) após irradiada e B) diluída no final em DMF num factor de 4.

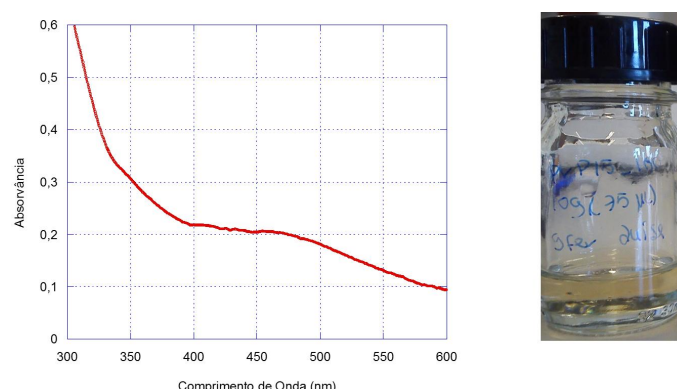


Figura 3.4: Espectro de absorvância e foto da solução PVP15\_100 ao fim de duas semanas num frasco exposto à luz ambiente.

As AgNPs formadas na solução PVP15\_100 também foram observadas por TEM em fibras obtidas por electrofiação simples a partir desta solução (os parâmetros de produção destas fibras estão indicados na tabela 3.4). As imagens destas fibras com as partículas e o histograma dos diâmetros das partículas estão apresentados na figura 3.8. Verifica-se que as partículas estão dispersas pela fibra, apresentando diâmetros de  $9,7 \pm 0,4$  nm, em concordância com o registado anteriormente na figura 3.6. Assim, verifica-se que a forma e o tamanho das AgNPs no filme e nas fibras electrofiadas, obtidos a partir da solução PVP15\_100, são os mesmos.

Durante a aquisição destas imagens de TEM, observou-se que havia partículas sobre a grelha de *formvar* que não estavam portanto incorporadas nas fibras. Esta observação, apesar da respectiva imagem não ter ficado registada, levantou a suspeita de que as AgNPs poderem soltar-se das fibras.

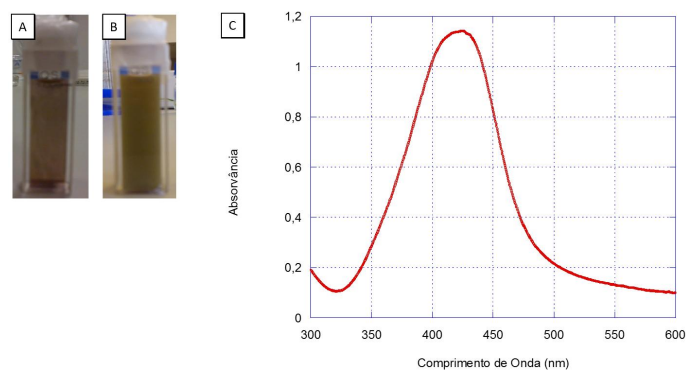


Figura 3.5: Imagens da solução PVP15\_100 exposta à luz ambiente numa célula de quartzo A) ao fim de uma semana B) no final de três meses. C) Espectro de absorvância da solução no final dos três meses.

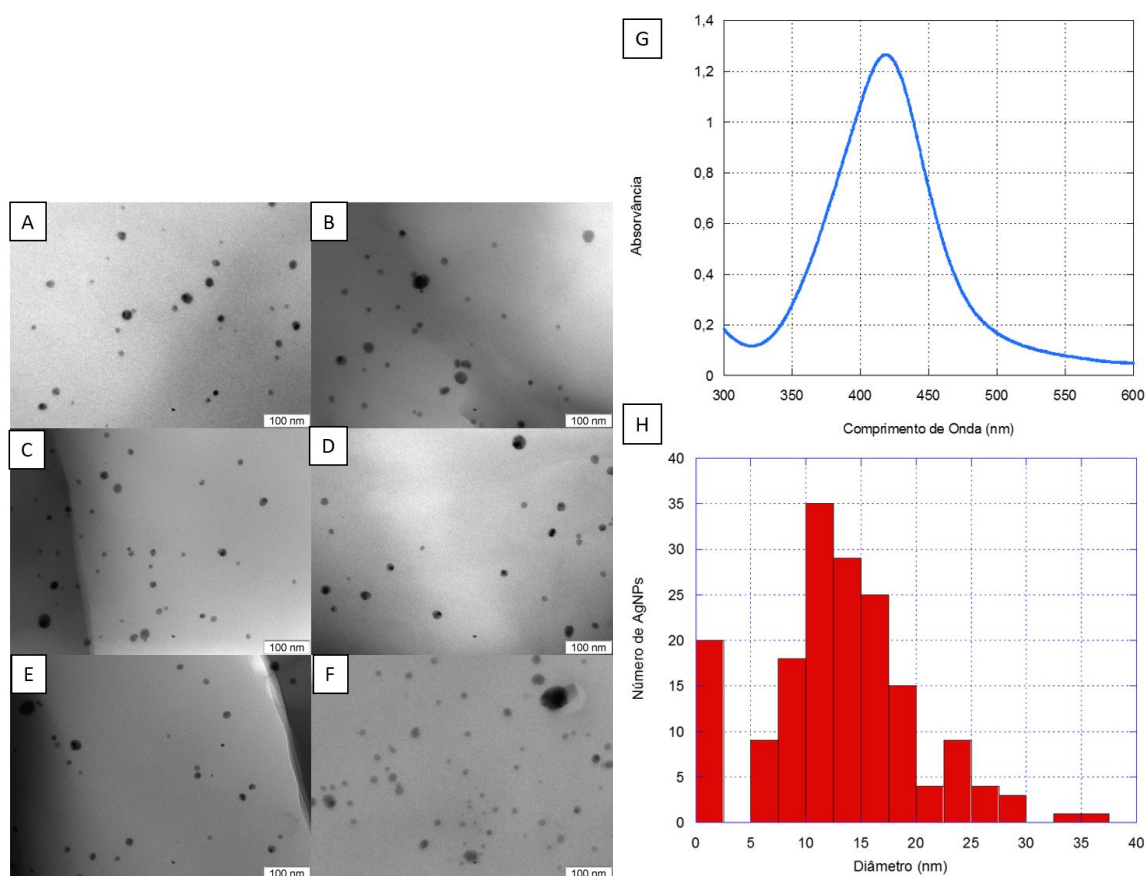


Figura 3.6: Caracterização das AgNPs produzidas na solução PVP15\_100: A)-F) Imagens de TEM do filme obtido da solução diluída em DMF em diferentes zonas (a barra de escala nas imagens corresponde a 100 nm), G) espectro de absorvância da solução diluída e H) histograma com a distribuição dos diâmetros das AgNPs nas imagens A-F.

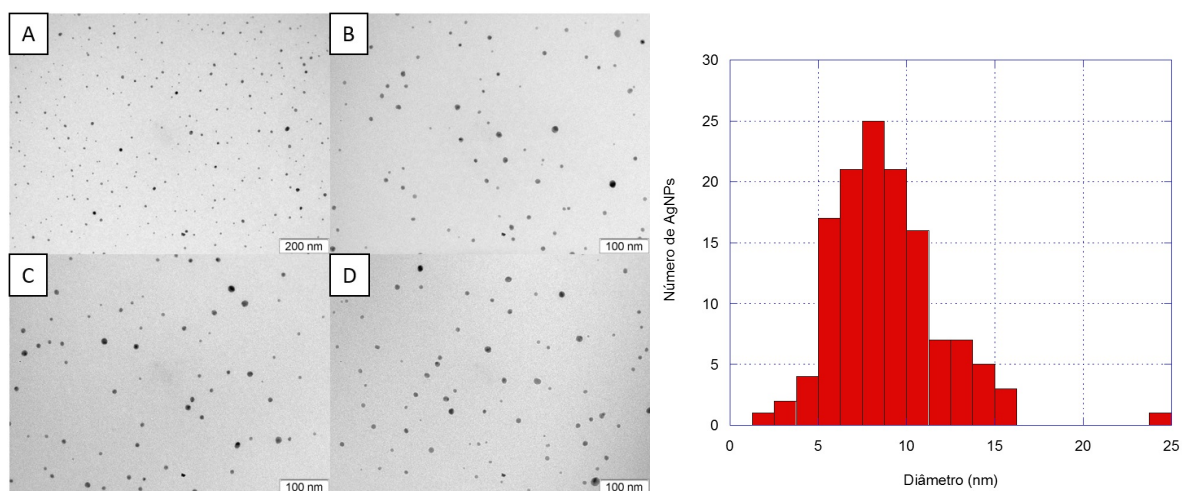


Figura 3.7: A)-D)Imagens de TEM das partículas presentes num filme produzido a partir da solução PVP15\_100 diluída em etanol em diferentes zonas da amostra (a barra de escala é de 200 nm na figura A e de 100 nm nas restantes). À direita das imagens apresenta-se o histograma com a distribuição dos diâmetros das AgNPs das imagens.

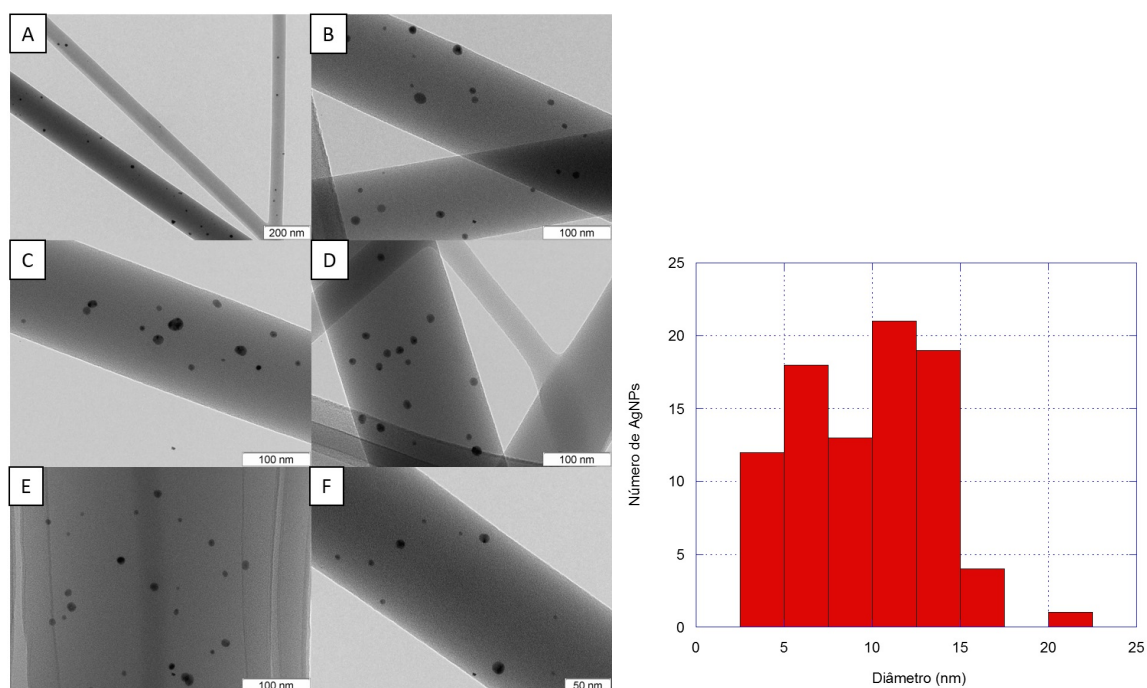


Figura 3.8: Imagens obtidas da matriz produzida a partir da solução PVP15\_100 por TEM em diferentes zonas da amostra e em diferentes escalas. A)200 nm. B-E)100 nm. F)50 nm. Ao lado está representado o respectivo histograma com a distribuição dos tamanhos das AgNPs.



## 3.2 Produção das fibras

### 3.2.1 Electrofiação Simples

As soluções poliméricas com as AgNPs, tabela 2.2, foram fiadas com sucesso. Na tabela 3.1 está indicada a gama dos parâmetros utilizados para testar e ajustar o processo relativamente a cada solução.

Tabela 3.1: Parâmetros de electrofiação utilizados nos testes realizados tendo em vista a produção da matriz com AgNPs por electrofiação simples.

Designação	Caudal (mL/h)	Tensão (kV)	Distância (cm)	Capilar (G)	Temperatura (°C)	H.R. (%)
S1	0,3-0,5	10-14	20	23	25-26	42-44
S2	0,3-0,5	10-12	20-25	23	25-26	42-43
S3	0,3-0,5	10-14	20-25	23 e 25	22-26	42-48
S4	0,1-0,5	10-12	15-25	23	19-23	48-69
S5	0,3-0,5	12-14	20-25	23	24-26	42-55
S6	0,3	12	20	23	20-22	39-67

Como a solução S6 apresentava uma maior razão entre as massas de polímeros e de prata que incorpora (razão total de polímeros para  $\text{AgNO}_3$  de 300:1), esta solução apresentava vantagem tendo em conta que se pretendia detectar por espectroscopia de UV-vis a libertação de AgNPs a partir da matriz electrofiada. Como a sua fiação não levantou dificuldade, foi a solução escolhida para a produção das matrizes por electrofiação simples a utilizar nas restantes partes do trabalho. Assim, o processo de fiação desta solução foi optimizado, estabelecendo-se, com base nas imagens de microscopia óptica que se apresentam na figura 3.9, os parâmetros indicados na tabela 2.3. Estas imagens revelam fibras relativamente regulares. Na literatura é possível encontrar referências à fiação de soluções de PCL em misturas de DMF e clorofórmio [65][66]. Embora a introdução do DMF pareça dificultar o processo, este solvente é responsável pela produção de fibras de diâmetros menores devido a aumentar a condutividade das soluções.

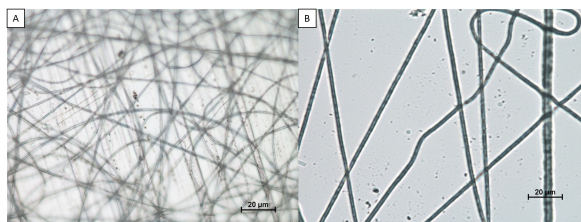


Figura 3.9: Imagens obtidas por microscopia óptica das fibras electrofiadas a partir da solução S6, em modo A) de emissão e B) transmissão.

Aquando da produção das matrizes, é por vezes necessário proceder a pequenos ajustes na tensão para evitar a formação de uma gota na ponta da agulha. O processo de produção de uma matriz estende-se por 8 horas. As imagens de SEM apresentadas na figura 3.10 confirmam a produção de matrizes de fibras regulares, com diâmetros no intervalo  $700 \pm 340$  nm.

Analisando as imagens das fibras electrofiadas a partir de S6, figura 3.11, obtidas por TEM, verifica-se que as AgNPs incorporadas apresentam forma e tamanho idênticos aos encontrados nos filmes produzidos a partir da solução PVP15-100 diluída em DMF. O diâmetro médio é  $11,4 \pm 1,0$  nm.

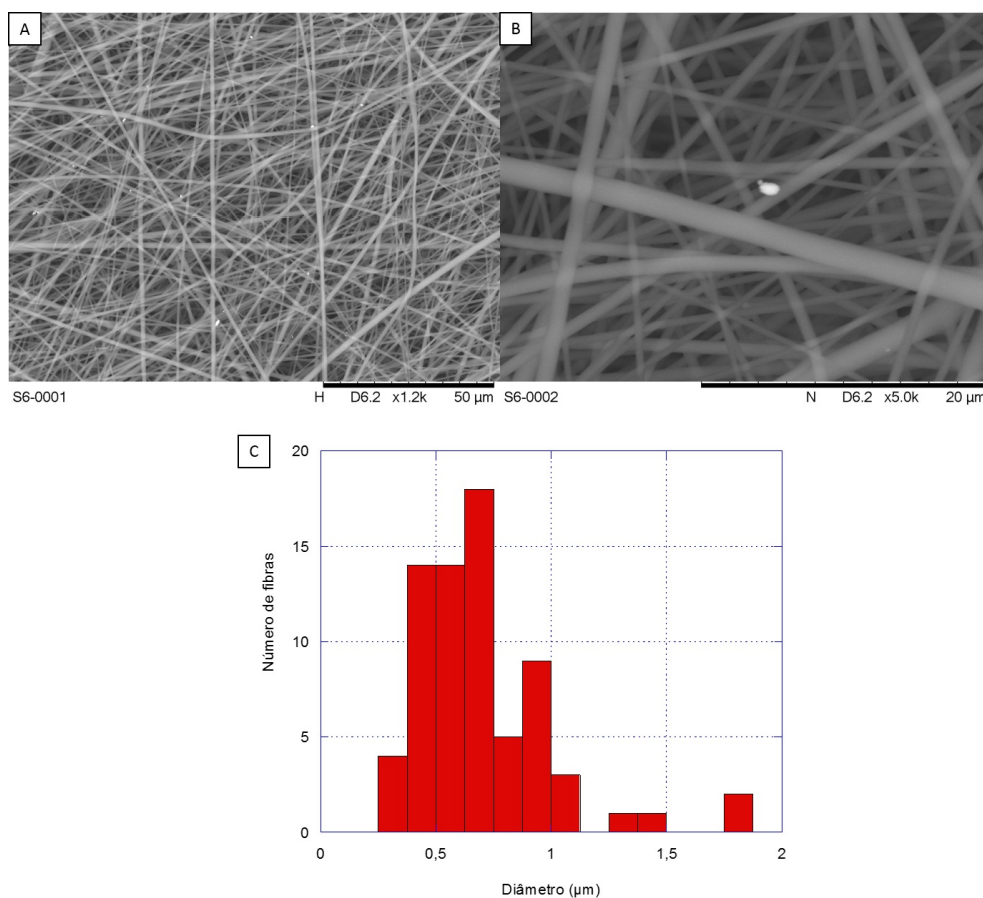


Figura 3.10: Imagens de SEM de fibras electrofiadas a partir da solução S6. A) Barra de escala de 50μm. B) Barra de escala de 20μm. C) Histograma com a distribuição de diâmetros das fibras produzidas.

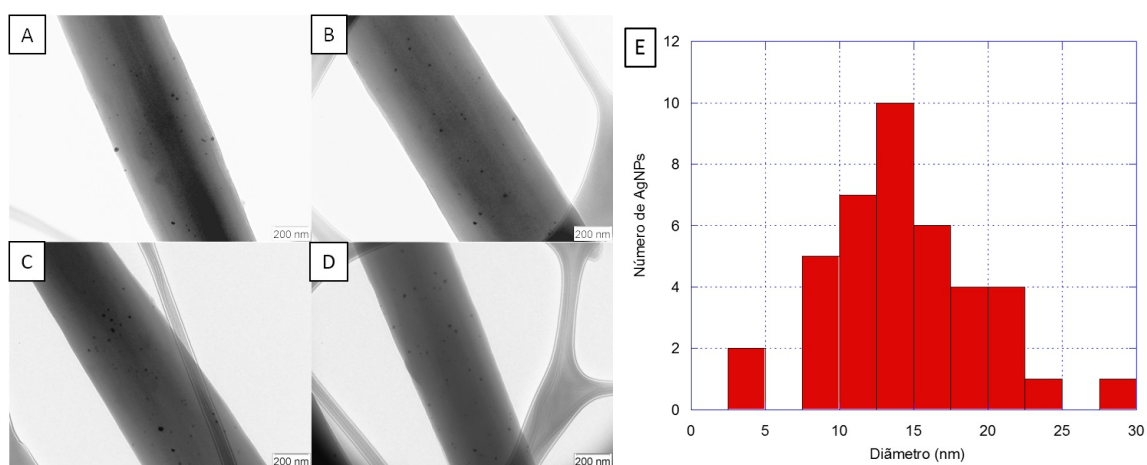


Figura 3.11: Imagens obtidas da matriz produzida a partir da solução S6 por TEM em diferentes zonas da amostra, numa escala de 200 nm. Ao lado está representado o respectivo histograma com a distribuição dos tamanhos das AgNPs.



### 3.2.2 Electrofiação Coaxial

#### Testes de fiação

Um dos requisitos para que a electrofiação coaxial seja bem sucedida é a solução externa ser fiável. Desta forma, os testes de fiação coaxial foram sendo acompanhados de testes de fiação das soluções de PCL que foram sendo consideradas para a camada externa das fibras coaxiais. Também foi testada a fiação da solução PVP15\_100 usada como solução interna. Verificou-se que a produção de fibras a partir desta solução se consegue com os parâmetros indicados na tabela 3.4.

Para a solução externa, começou por considerar-se uma solução de PCL a 10% em clorofórmio que, de trabalhos anteriores efectuados no grupo, se sabia ser fácil de fiar. No entanto não foi possível estabilizar o processo de fiação coaxial usando esta solução.

A condutividade das soluções é um parâmetro muito importante nos processos de electrofiação. Segundo a literatura, para o processo de electrofiação coaxial é importante que a solução usada na camada externa seja mais condutora do que a interna. Como tal, e porque as soluções de PCL em clorofórmio são muito pouco condutoras, considerou-se dissolver o PCL numa mistura de clorofórmio e DMF. Existem referências a estudos de fiação deste tipo de soluções [66], sabendo-se por elas que o aumento da concentração de DMF dificulta o processo de fiação. Testaram-se várias proporções para a mistura usando o PCL a 10% e 12%. A solução de PCL dissolvido a 10% numa mistura com proporção DMF:clorofórmio de 2:8 é fiável mas com alguma dificuldade em estabilizar o processo devido à formação de uma gota da ponta da agulha. Assim, aumentou-se a concentração de PCL para 12% para aumentar a viscosidade da solução (a formação da gota revela um domínio de tensão superficial que é possível contrariar aumentando a viscosidade). Com esta concentração a solução, que passará a ser referida como PCL12\_DMF2\_Clorof8, foi facilmente fiável, usando os parâmetros indicados na tabela 3.4.

Mediram-se então as condutividades das soluções PVP15\_100 e PCL12\_DMF2\_Clorof8 bem como a de alguns conjuntos dos seus constituintes, como se mostra na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Condutividades das soluções e de solventes.

Designação	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
<b>PCL12_DMF2_Clorof8</b>	0,262
<b>DMF2_Clorof8</b>	0,438
<b>DMF</b>	2,271
<b>PVP15</b>	2,612
<b>PVP15_100</b>	301,4

Verificou-se que os valores das condutividades das soluções PCL12\_DMF2\_Clorof8 e PVP15\_100 são totalmente díspares: a segunda é cerca de 1000 vezes mais condutora. Esta elevada condutividade é causada pela presença das AgNPs, uma vez que a solução sem prata, PVP15, tem uma condutividade muito próxima da da DMF. Relativamente à solução de PCL, a presença do clorofórmio no solvente continua a ter uma influência determinante na condutividade deste (cerca de 6 vezes menor do que a da DMF) e o PCL faz diminuir por um factor de 2 a condutividade da solução relativamente à do solvente.

De forma a contornar o problema da baixa condutividade da solução externa, considerou-se utilizar um sal. Dados bibliográficos [67] conduziram à escolha do cloreto de lítio anidro (LiCl), que é facilmente dissolvido em DMF e permite aumentar significativamente a sua condutividade. Assim, analisaram-se as condutividades da solução PCL12\_DMF2\_Clorof8 para diferentes concentrações de

LiCl adicionado à DMF usada como solvente. Os resultados apresentados na tabela 3.3 permitem constatar que para uma concentração de 10 mg/mL consegue-se aumentar a condutividade da solução externa para valores da ordem de grandeza dos da solução interna, pelo que foi esta a selecionada para ser fiada.

Tabela 3.3: Condutividade da solução externa para diferentes concentrações de LiCl.

Concentração (mg/mL)	Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )
<b>2</b>	130,3
<b>4</b>	253,0
<b>8</b>	286,2
<b>10</b>	316,4

Com o aumento da condutividade devido à adição do sal, o processo de fiação simples da solução PCL12\_DMF2\_Clorof8 é menos estável mas ainda foi possível obter fibras nas condições apresentadas na tabela 3.4.

Tabela 3.4: Parâmetros de electrofiação utilizados nas soluções de PVP com AgNPs e nas de PCL em DMF e clorofórmio.

Designação	Caudal (mL/h)	Tensão (kV)	Distância (cm)	Capilar (G)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	H. R.(%)
<b>PVP15_100</b>	0,3	15	20	23	22	54-55
<b>PVP10_100</b>	0,5	15	20	23	22	54-55
<b>PCL12_DMF2_</b> <b>Clorof8</b>	0,3	12	20	23	23	41-42
<b>PCL12_DMF2_</b> <b>Clorof8</b> <b>com LiCl</b>	0,3	13	20	23	23	41-42

### Produção de fibras coaxiais

Como ponto de partida para ajuste dos parâmetros de electrofiação coaxial, considerou-se que seria conveniente que os caudais de ejeção das duas soluções implicassem que as soluções eram injectadas aproximadamente com a mesma velocidade, isto é, que sua relação fosse aproximadamente:

$$\frac{\phi_{ext}}{\phi_{int}} = \frac{A_{ext}}{A_{int}} \quad (3.1)$$

onde  $\phi_{ext}$  e  $\phi_{int}$  são os caudais de ejeção da solução externa e da solução interna e  $A_{ext}$  e  $A_{int}$  as áreas das secções rectas dos capilares por onde passam as soluções externa e interna, respectivamente. Para os capilares utilizados as razões anteriores são 1,65.

Após o insucesso da fiação coaxial usando como solução exterior a solução de PCL a 10% em clorofórmio e das averiguações anteriores, produziram-se fibras coaxiais das seguintes soluções:

**Solução interna PVP15 e a solução externa PCL12\_DMF2\_Clorof8**

Tendo em conta que a condutividade elevada das soluções pode levantar dificuldades na sua fiação, testou-se o processo de electrofiação coaxial utilizando para a camada interna a solução de PVP a 15% em DMF, sem prata, e a solução PCL12\_DMF2\_Clorof8, sem sal, para a externa. Verificou-se que o processo foi fácil de estabilizar com os parâmetros apresentados na tabela 3.5.

Tabela 3.5: Parâmetros de electrofiação coaxial utilizando como solução interna PVP15 e como externa PCL12\_DMF2\_Clorof8.

Caudal interno (mL/h)	Caudal externo (mL/h)	Tensão (kV)	Distância (cm)	Capilar interno (G)	Capilar externo (G)	Temperatura (°C)	H. R. (%)
0,6	1	12	20	22	18	21-22	54-64

As fibras obtidas foram observadas no microscópio óptico, figura 3.12, e constata-se que estas são uniformes com diâmetros da ordem de alguns  $\mu\text{m}$ .

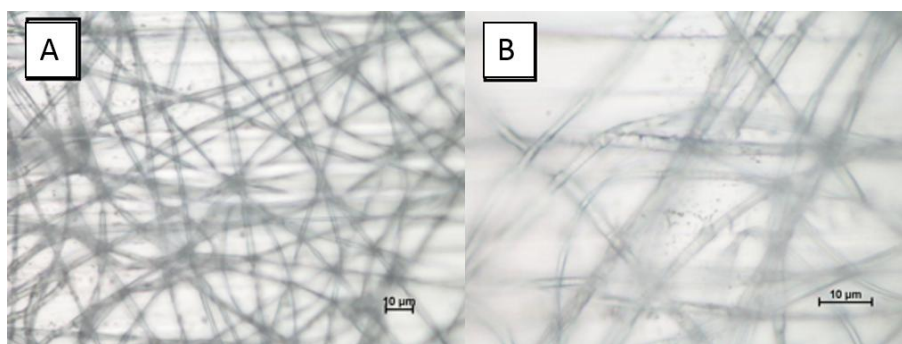


Figura 3.12: Imagens obtidas por microscopia óptica de fibras coaxiais: solução interna- PVP15; solução externa- PCL12\_DMF2\_Clorof8. A) Ampliação 500x. B) 1000x.

A estabilidade do processo com estas soluções vem refutar o descrito na literatura [49], que indicava que a solução externa teria de ter uma condutividade elevada. Como podemos observar 3.2, a solução interna é, neste caso, cerca de 10 vezes mais condutora do que a externa.

**Solução interna PVP15\_100 e solução externa PCL12\_DMF2\_Clorof8**

Quando se passou à fiação coaxial das fibras com prata, houve a preocupação de tentar produzir matrizes que tivessem uma constituição semelhante à das fibras fiadas por electrofiação simples. Nesta condição poder-se-á comparar o efeito único do tipo de encapsulamento na taxa de libertação.

A composição das fibras electrofiadas por fiação simples a partir da solução S6 pode ser inferida da composição da solução fiada apresentada na tabela 2.2. Assim, as fibras simples apresentam uma razão mássica PCL:PVP de 2 e uma razão entre a massa total de polímero e a massa de  $\text{AgNO}_3$  usada para a sua produção de 300:1. Para estabelecer uma razão entre os caudais das soluções externa e interna que conduziisse a uma constituição semelhante a esta, fez-se a seguinte análise: as fibras resultantes do processo de electrofiação coaxial possuem uma constituição que depende da concentração dos polímeros nas soluções interna e externa e dos caudais a que são ejectadas. A massa de cada polímero depositada por hora a partir de uma concentração polimérica  $C$  (em massa) e densidade  $\rho$  e cujo caudal é  $\phi$  é dada pela equação 3.2.

$$\rho \times C \times \phi \quad (3.2)$$

Assim, quando os caudais de ejeção das soluções externa e interna são estabelecidos com os valores  $\rho_{ext}$  e  $\rho_{int}$ , respectivamente, a razão mássica PCL:PVP nas fibras é dada pela equação 3.3. Forçando esta razão para o valor 2 (o mesmo que tem nas fibras simples), a razão dos caudais deverá obedecer à equação 3.4.

$$\frac{\rho_{ext} \times C_{ext} \times \phi_{ext}}{\rho_{int} \times C_{int} \times \phi_{int}} \quad (3.3)$$

$$\frac{\phi_{ext}}{\phi_{int}} = 2 \times \frac{\rho_{int}}{\rho_{ext}} \times \frac{C_{int}}{C_{ext}} \quad (3.4)$$

Por seu lado, a razão entre a massa total de polímero nas fibras e a massa de  $\text{AgNO}_3$  que foi usada para a sua produção é dada pela equação 3.5 onde o factor 100 corresponde à razão PVP: $\text{AgNO}_3$  na solução interior. Substituindo a condição 3.4 em 3.5 chega-se a um valor para a razão entre a massa total de polímero e a massa de  $\text{AgNO}_3$  de 300:1 tal como nas fibras simples.

$$\frac{m_{polimero}}{m_{AgNO3}} = 100 \times \left[ \frac{\rho_{ext} \times C_{ext}}{\rho_{int} \times C_{int}} \times \frac{\phi_{ext}}{\phi_{int}} + 1 \right] \quad (3.5)$$

Para estabelecer a razão 3.4 para os caudais das soluções interna e externa foram determinadas as densidades das soluções PVP15\_100 (interna) e PCL12\_DMF2\_Clorof8 (externa), tendo sido obtidos os valores apresentados na tabela 3.6.

Tabela 3.6: Densidade das soluções interna e externa usadas na electrofiação coaxial.

Designação da solução	Densidade (g/mL)
<b>PVP15_100</b>	0,998
<b>PCL12_DMF2_Clorof8</b>	1,322

Como se pode constatar a densidade da solução externa é significativamente diferente de 1 devido à elevada densidade do clorofórmio.

Substituindo os valores das concentrações ( $C_{ext}=12$  e  $C_{int}=15$ ) e das densidades ( $\rho_{ext}=1,322$  e  $\rho_{int}=0,998$ ), tabela 3.6, em 3.4, obtemos para a razão entre caudais o valor 1,89.

Como já foi referido, a fiação da solução sem sal foi bem sucedida porém, quando se torna esta solução como solução externa no processo de fiação coaxial, o processo não estabiliza facilmente.

Variando os caudais (mantendo a razão de 1,89 entre eles), a tensão e distância entre o colector e o injector, não se conseguiu estabilizar por completo o processo, uma vez que acaba por sempre por se formar uma gota na ponta do injector. Mesmo conjugando caudais baixos com tensões elevadas o problema persiste. No entanto, para a gama de parâmetros indicados na tabela 2.4, a formação da gota foi mais lenta e o jacto manteve alguma estabilidade.

Apesar da solução PCL12\_DMF2\_Clorof8 com sal ter levantado alguns problemas, procedeu-se ao teste de fiação usando esta como solução externa. Após a variação de todos os parâmetros do processo, concluiu-se que não era possível estabilizar o mesmo, uma vez que havia sempre formação e emissão de gotas, formação de múltiplos jactos para as tensões mais elevadas e crescimento da deposição das fibras no ar. Estas características que em parte podem ser devidas à elevada condutividade das soluções e às dimensões do injector, impediram a utilização da solução PCL12\_DMF2\_Clorof8 com sal como camada externa, e passou-se a usar a solução sem sal. No entanto, foi sempre necessária a supervisão do processo durante as deposições dada a possibilidade de ocorrer projecção das gotas e instabilidade do jacto. Dada a necessidade de limpar a ponta do injector coaxial de quando em vez, a limpeza teve

de ser feita com extremo cuidado já que os capilares do injetor facilmente se desalinham. Em suma, não se conseguiu otimizar o processo da fiação coaxial das soluções em causa.

As imagens de SEM, figura 3.13, mostram que as fibras não são uniformes. Do histograma, figura 3.13 E, conclui-se que as fibras apresentam diâmetros numa gama entre os 0,25 e 1,5  $\mu\text{m}$ , com um valor médio de  $866 \pm 50$  nm.

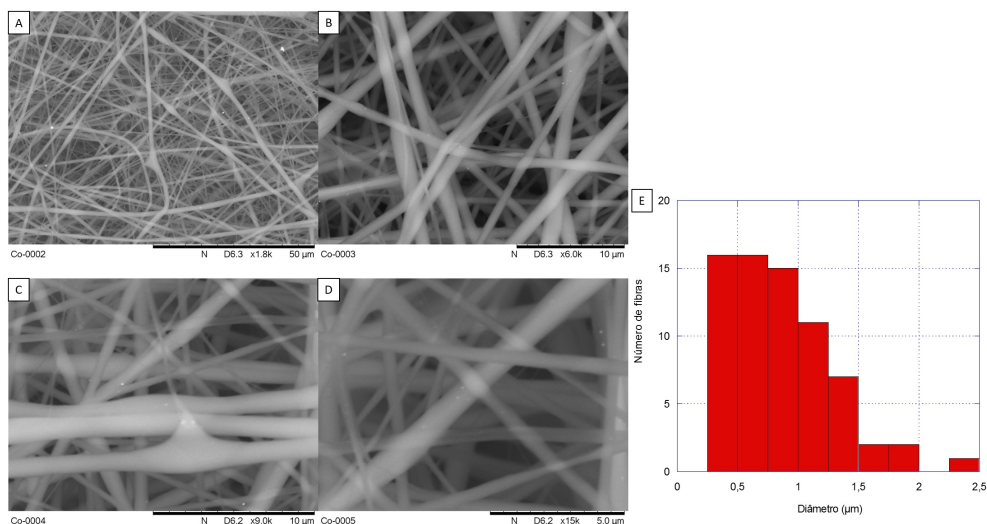


Figura 3.13: Imagens de SEM das fibras coaxiais: A) barra de escala de  $50\mu\text{m}$ , B e C) barra de escala de  $10\mu\text{m}$ , D) barra de escala de  $5\mu\text{m}$ . E) Histograma com a distribuição de tamanhos das fibras produzidas.

As imagens de TEM das fibras produzidas por electrofiação coaxial encontram-se na figura 3.14. Da sua análise não se consegue observar um grande contraste entre as duas camadas dos materiais diferentes. Todavia, a distribuição das AgNPs ao longo das fibras permite concluir acerca do seu encapsulamento. Na figura 3.14 A-D, verifica-se que as AgNPs estão distribuídas longitudinalmente ao longo da fibra sem nunca estarem próximas dos limites da sua superfície. Dada a montagem do injetor coaxial, figuras 2.3 e 2.4, seria de esperar uma fibra coaxial com uma camada interna de diâmetro superior ao da camada externa, pelo que as AgNPs deveriam ocupar, tal como observado nestas imagens, a maior parte da fibra à excepção de uma fina camada externa.

Por outro lado, observando a figura 3.14 E e F, a distribuição das AgNPs é apenas do lado direito da fibra. Isto pode dever-se a um deficiente alinhamento dos eixos dos capilares. Nesta fibra o PVP com AgNPs está exposto à superfície da mesma.

Nas figuras 3.14 G e H registam partículas por toda a fibra, desde o interior até à superfície. Tal verifica-se sobretudo nas zonas das fibras mais largas, zonas que se assemelham a fusos. Quando isto acontece pode significar que as duas soluções estão misturadas ou que injeção da solução externa foi interrompida. Conclui-se então que as fibras não são coaxiais em toda a sua extensão.

As AgNPs observadas nas fibras coaxiais são esféricas e possuem um diâmetro médio de  $11,8 \pm 0,6$  nm, um pouco maiores do que o observado nas fibras simples. Por outro lado, aparentam estar presentes em maior densidade, o que se pode dever a uma maior quantidade de partículas de tamanhos menores ou ao seu maior confinamento.

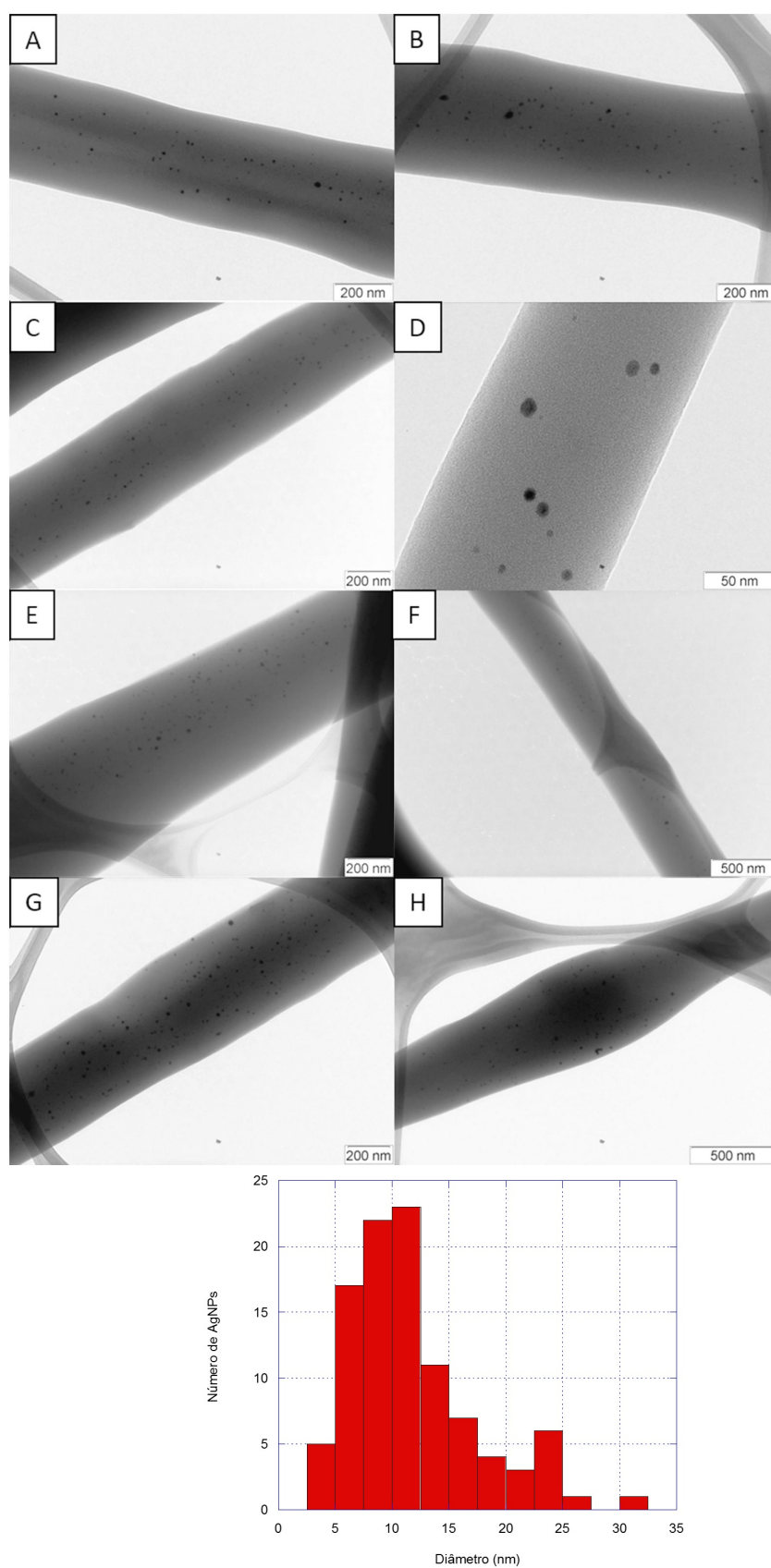


Figura 3.14: Imagens de TEM da matriz de nanofibras coaxiais em diferentes zonas da amostra. Em baixo está representado o histograma com a distribuição dos tamanhos das AgNPs visualizadas.

### 3.3 Ensaios de libertação de nanopartículas de prata a partir de matrizes

#### 3.3.1 Libertação a partir de matrizes de nanofibras simples

Os resultados da análise espectrofotométrica da libertação de AgNPs, em função do tempo de imersão em água, das matrizes obtidas por fiação simples estão registados graficamente na figura 3.15. Os espectros da banda SPR registados durante a libertação, a partir dos quais foi construída a curva apresentada nesta figura, mostram que o máximo da banda está posicionado nos 405 nm, figura A, o que indica que a maioria das partículas detectadas apresentam o mesmo aspecto dos obtidos durante a monitorização da síntese, figura 3.2. Como se pode observar na figura 3.15, inicialmente a libertação é rápida. A partir dos 120 minutos o ritmo abranda significativamente e a partir dos 600 minutos praticamente já não ocorre libertação, como comprova o patamar que se observa no gráfico a partir daí. Este perfil de libertação pode revelar a influência da hidrofobicidade do PCL que pode retardar um pouco a libertação por dificultar a penetração da água na matriz. No entanto, a hidrofilicidade do PVP e a sua dissolução na água contribuirão de forma decisiva para esta relativamente rápida libertação.

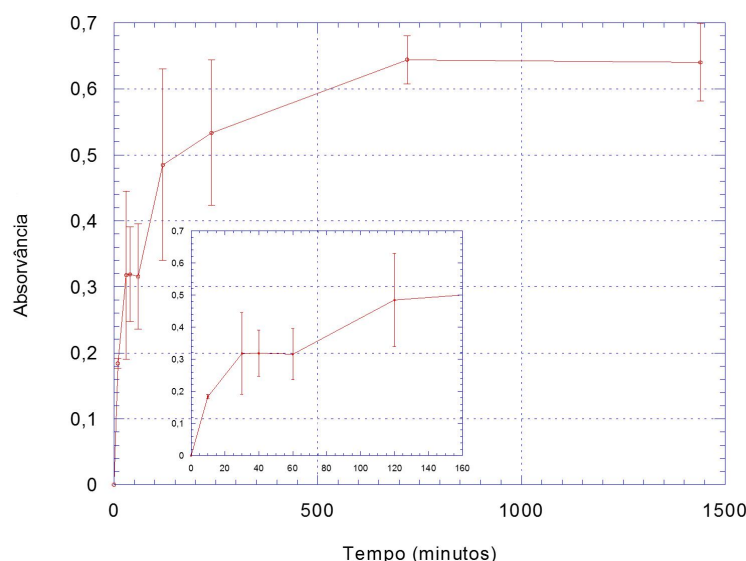


Figura 3.15: Análise espectrofotométrica da libertação de AgNPs a partir de matriz de nanofibras simples ao longo do tempo de imersão em água.

#### 3.3.2 Libertação a partir de matrizes de nanofibras coaxiais

Para as fibras coaxiais, a libertação ocorreu de forma ainda mais rápida e com uma intensidade significativamente superior à registada no ensaio das fibras simples, figura 3.17. Deste modo, acrescentou-se mais um tempo de análise: 5 minutos. Ao fim de 5 minutos, a absorvância correspondente à concentração de partículas libertadas já atingiu os 1,2 (pouco menos do dobro do valor de absorvância registado no patamar da libertação de AgNPs a partir de fibras simples). Este resultado foi inesperado. A concentração de partículas libertadas aumentou até aos 40 minutos, tempo a partir do qual se atingiu o patamar, registando-se um valor máximo de absorvância de 1,9 (cerca de 3 vezes

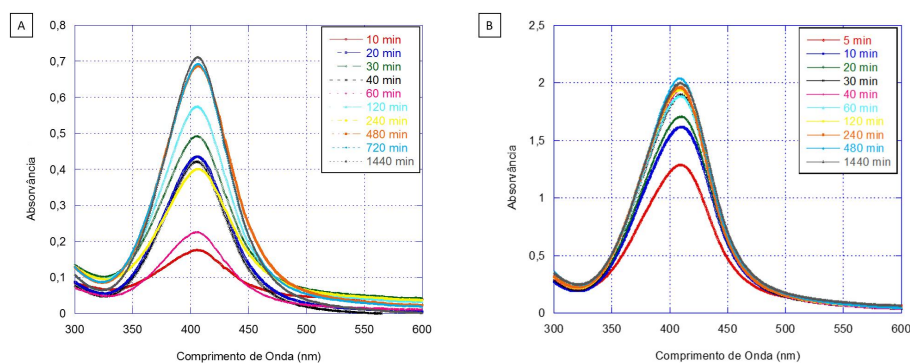


Figura 3.16: Espectros de UV-vis da libertação de AgNPs a partir de matrizes de nanofibras A) simples e B) coaxiais.

superior ao registados nos ensaios com a matriz simples). Os espectros de absorvância registados, figura 3.16B), indicam que os máximos da banda SPR se localizam numa gama de valores de  $\lambda$  entre os 405 e 410 nm. Tal como já se tinha verificado para as nanofibras simples, estes valores, menores do que os observados durante a monitorização da síntese das partículas, indicam que as partículas detectadas durante a libertação têm menor dimensão do que incorporadas nas fibras. A posição do máximo da SPR não se alterou em função do tempo.

As imagens de TEM, exemplo na figura 3.17, revelaram AgNPs esféricas e com um diâmetro médio de  $9,4 \pm 0,6$  nm. Pelo histograma, figura 3.17, também se verifica que foram detectadas mais AgNPs de menores dimensões. Como estas partículas estavam encapsuladas em fibras supostamente coaxiais, pode-se aferir que as AgNPs libertadas apresentam um menor valor médio menor do que as encapsuladas nas fibras coaxiais.

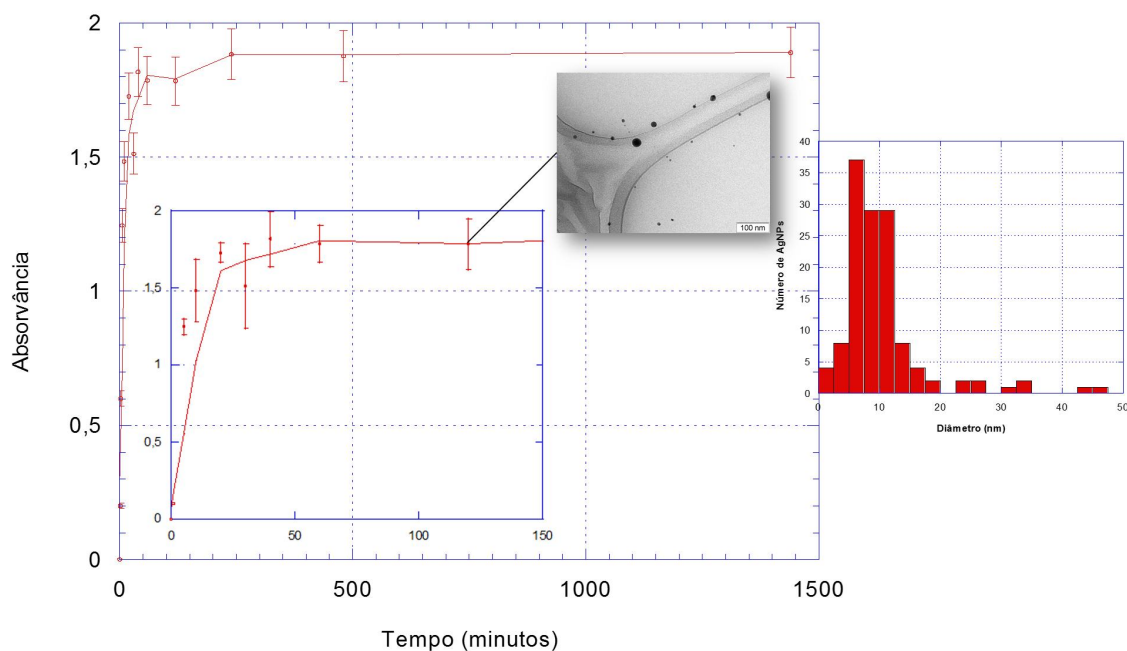


Figura 3.17: Representação gráfica da libertação de AgNPs a partir de matriz de nanofibras coaxiais ao longo do tempo. Imagem de TEM das AgNPs libertadas aos 120 minutos e o histograma com a distribuição dos tamanhos das AgNPs visualizadas.



### 3.4 Teste de citotoxicidade

Como foi apresentado na secção 2.3, nos testes de extracto avalia-se a citotoxicidade de um material com base na viabilidade celular de células em cultura num meio condicionado pelo material relativamente à de um controlo negativo (situação não tóxica). De acordo com a classificação adoptada por Humpolicek et al. para os testes de extracto [68], classificaram-se os materiais como: não citotóxico se a viabilidade celular relativa (VC) for superior a 80%; ligeiramente citotóxico se estiver compreendida entre os 60 e os 80%; de citotoxicidade moderada entre os 40 e os 60%, e fatal para VC inferiores a 40%.

#### 3.4.1 Ensaio I

Após 24 horas de incubação da cultura celular nos extractos, foram avaliadas as viabilidades celulares nas várias condições usando o teste colorimétrico com recurso à resazurina. Como ilustrada anteriormente, figura 2.7, os testes foram realizados em quintuplicado. Neste ensaio, partiu-se de uma razão de massa de matriz/Volume de meio condicionado (m/V) máxima de 15 mg/mL, e a maior diluição correspondeu a uma razão de 0,3125 mg/mL. Também se testou a razão máxima de 15 mg/mL de massa de matriz sem prata. Neste ensaio apenas se estabeleceu um controlo celular negativo. Verificou-se para todas as razões m/V testadas, que a viabilidade celular relativa está acima dos 90% pelo que se pode concluir que os extractos nas concentrações testadas não apresentam efeitos tóxicos para as células utilizadas, figura 3.18.

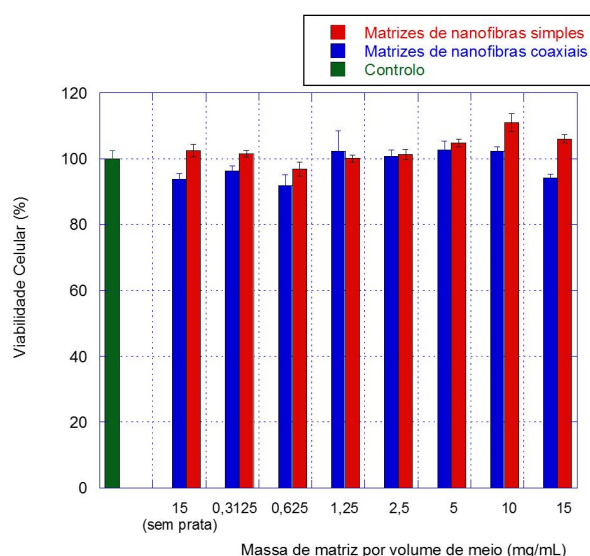


Figura 3.18: Representação gráfica da viabilidade celular relativa (%) do ensaio I.

Os meios condicionados pelo extracto das matrizes com AgNPs (na concentração de 15 mg/mL) foram analisados por espectrofotometria de UV-vis, usando uma célula de 1 cm de percurso óptico e a célula com meio de cultura como referência, figura 3.19. Observou-se que a banda de SPR característica das AgNPs exhibe algumas diferenças relativamente à observada aquando da libertação das AgNPs para a água (figura 3.16): a banda torna-se mais larga e com dois picos e o máximo (correspondente ao pico mais à direita) encontra-se deslocado para comprimentos de onda maiores. Estas alterações reflectem a interação das AgNPs com as proteínas do meio de cultura, sofrendo alterações. Banderjee et al., [69] verificou que existe uma relação entre a concentração proteica e a existência de

um mínimo na intensidade da banda de SPR, independente da massa e forma das proteínas. Este mínimo foi explicado com base no desdobramento das proteínas e das ligações que ocorrem graças à afinidade entre as AgNPs e alguns aminoácidos [1]. Num estudo de Kittler et al [70], concluíram que a proteína albumina do soro bovino (SBA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) e as AgNPs formam complexos por forças electroestáticas e de *Van der Waals*, alterando a sua estrutura [71]. Assim, as bandas de SPR registadas ilustram as alterações das AgNPs resultantes da sua interação com as proteínas que compõem o meio de cultura.

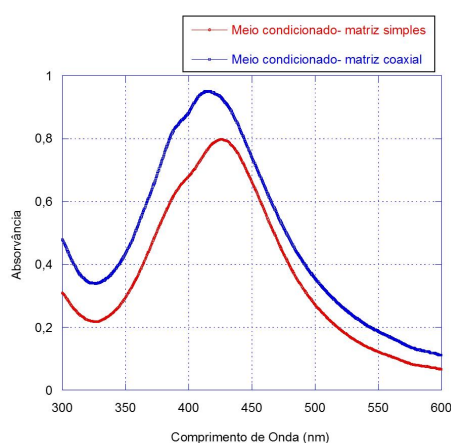


Figura 3.19: Espectros de UV-vis dos meios condicionados pelo extracto das matrizes de nanofibras simples e coaxiais, para a razão de 15 mg/mL.

### 3.4.2 Ensaio II

Em face dos resultados do primeiro ensaio *in vitro*, o segundo ensaio foi realizado para razões de m/V maiores. Como a razão maior que se conseguiu imergir completamente no meio de cultura foi de 30 mg/mL, partiu-se desta razão máxima para se realizarem novas diluições até à razão mínima de 3 mg/mL. Neste ensaio, para além do controlo negativo, já se estabeleceu o controlo positivo. Como o gráfico da viabilidade celular ilustra, figura 3.20, voltou a verificar-se que para estas razões m/V as matrizes produzidas, os extractos com as AgNPs libertadas, não apresentam qualquer efeito tóxico para as células.

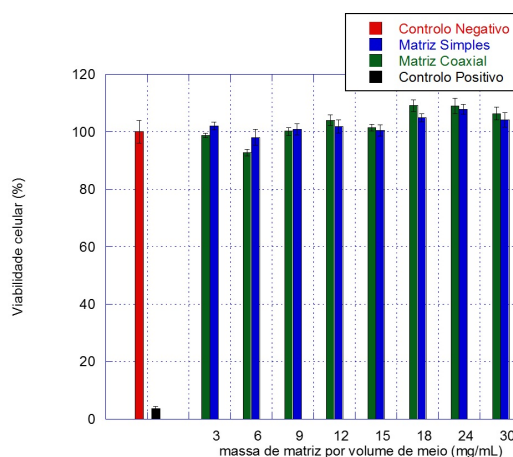


Figura 3.20: Representação gráfica da viabilidade celular relativa (%) do ensaio II.

### 3.4.3 Ensaios III e IV

Dados os resultados anteriores, decidiu-se prolongar o teste de citotoxicidade para diferentes tempos. Desta forma, estendeu-se a análise para 48 e 72 horas de contacto dos meios condicionados pelos extractos com as células. A razão m/V foi restringida para apenas 3 valores: 30, 20 e 15 mg/mL. Os resultados estão apresentados na figura 3.21.

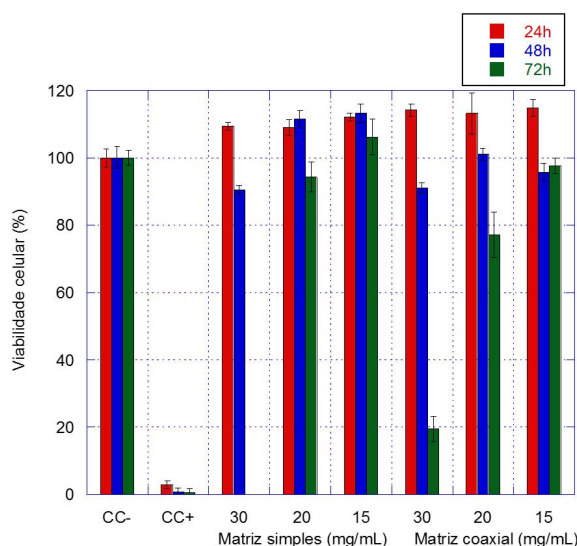


Figura 3.21: Representação gráfica da viabilidade celular relativa (%) do ensaio III, para os diferentes tempos de incubação.

Como se pode verificar, após 24 horas de incubação em meio condicionado, a viabilidade celular determinada foi acima dos 100%, não apresentando os extractos efeitos tóxicos nas concentrações testadas. Depois de 48 horas, a viabilidade celular continua acima dos 90%, mas verifica-se uma diminuição significativa na VC para a razão de 30 mg/mL, tanto para a matriz simples como para a coaxial, relativamente às outras razões que estão acima dos 100% no caso da matriz simples. Aquando da preparação da placa para as 72 horas, já não houve volume suficiente do meio condicionado resultante da matriz simples para preencher todos os poços. Desta forma, a razão m/V máxima só foi analisada para o meio condicionado pelo extracto da matriz coaxial. Constatou-se neste caso que a VC diminuiu para 19%, o que significa que houve morte celular. Este resultado foi comprovado por observação do microscópio invertido dos poços, pelo que se pode concluir que para a razão 30 mg/mL, o extracto da matriz coaxial revela efeitos tóxicos ao fim de 72 horas de contacto com as células. Também se observa que para a razão 20 mg/mL houve uma diminuição da VC, mais ligeira no caso da matriz simples mas mais acentuada para a matriz coaxial (que é agora de cerca de 77%). Para 15 mg/mL não se regista nenhum efeito citotóxico para ambas as matrizes. Por forma a comprovar os resultados obtidos e para analisar o efeito do meio condicionado pelo extracto da matriz simples na concentração 30 mg/mL para um tempo de contacto com as células de 72 horas, este ensaio foi repetido tendo sido obtidos os resultados indicados na figura 3.22.

Para as 24 horas de incubação os resultados foram semelhantes aos dos ensaio III com a excepção da VC determinada para a razão de 30 mg/mL da matriz coaxial, que foi de 63.5%. Por observação ao microscópio, verificou-se que havia de facto alguma quantidade de células mortas e que a densidade celular nos poços desta condição era pequena relativamente às restantes. Nos restantes casos, a VC era igual ou superior a 100%. Após as 48 horas de incubação, as VC diminuíram para

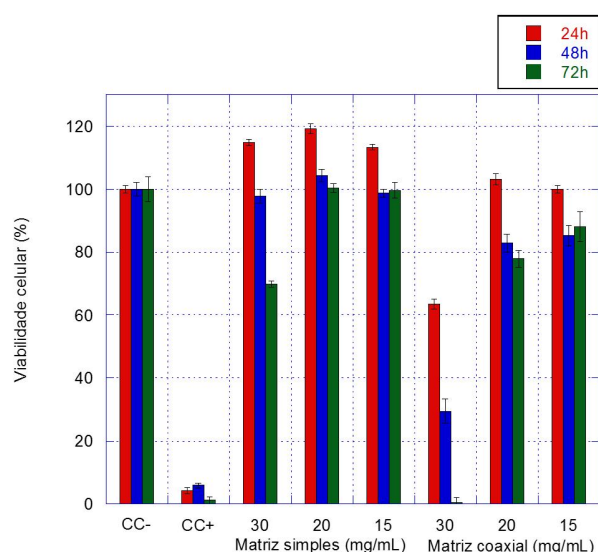


Figura 3.22: Representação gráfica da viabilidade celular relativa (%) do ensaio IV, para os diferentes tempos de incubação.

todas as razões m/V da matriz coaxial que passou para cerca de 30% para as 30 mg/mL (cerca de metade do dia anterior) e veio para cerca dos 80% no caso das outras duas condições. Para a matriz simples não se observou qualquer efeito citotóxico. Para as 72 horas a VC, para a razão de 30 mg/mL, diminuiu tanto para a matriz coaxial (que é agora de apenas 0,5%), como para a matriz simples (para a qual se registou o valor de 70%). Para as outras razões, as VC rondam os 100% no caso do extracto da matriz simples e mantém-se superior a 77% no da coaxial.

Como os resultados para a matriz simples foram congruentes, pode-se concluir que estas não apresentam efeitos citotóxicos para as razões de 20 e 15 mg/mL; para 30 mg/mL estes efeitos não são perceptíveis até às 48 horas de contacto com as células mas para as 72 horas de já se revela um efeito citotóxico ligeiro. Relativamente à matriz coaxial, apesar da discrepância entre os valores obtidos nos dois ensaios relativamente à razão máxima, pode concluir-se relativamente à razão de 30 mg/mL que o extracto da matriz apresenta uma ligeira citotoxicidade às 24 horas e é fatal a partir das 48 horas. Para os 20 mg/mL não se revelam efeitos citotóxicos até às 48 horas de contacto mas às 72 horas já se observa uma citotoxicidade ligeira. Já para 15 mg/mL, não se observam efeitos citotóxicos nos três tempos.

Os meios de extracto usados neste último ensaio foram analisados por espectrofotometria de UV-vis, recorrendo a uma célula de quartzo de 1 mm de percurso óptico (com meio de cultura como referência). O meio condicionado pelos extractos, 30 mg/mL, foram analisados após as 24 horas do acondicionamento. Novamente, os espectros, figura 3.23, revelam bandas de SPR com uma largura maior do que os de libertação de AgNPs para a água (figura 3.16), o que pode significar que ocorreu interação das AgNPs com as proteínas do meio de cultura. Nestes espectros as bandas de SPR não estão tão próximas como os espectros da figura 3.19, o que implica que houve uma libertação de AgNPs significativamente maior no extracto da matriz coaxial. Também não se verificam os dois picos observados anteriormente.

Como se trata de um teste colorimétrico, as diferenças das cores resultantes da redução da resazurina é visível na figura 3.24, que corresponde ao ensaio IV das 48 horas de contacto do meio condicionado com as células. As tonalidades dos poços correspondentes à matriz simples são mais

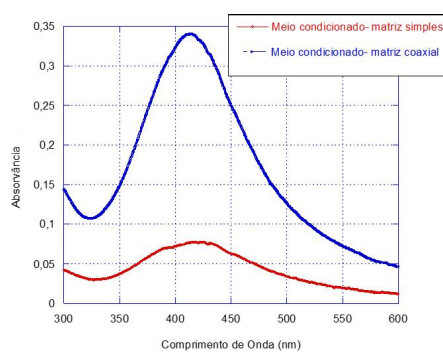


Figura 3.23: Espectros de UV-vis dos meios condicionados pelo extracto das matrizes de nanofibras simples e coaxiais, para a razão 30 mg/mL.

púrpura (maior VC) do que os da matriz coaxial (que são mesmo azuis). Estão ainda representadas as fotografias, obtidas pelo microscópio invertido, de poços da razão máxima m/V da matriz simples e coaxial, que permitem observar as células vivas e mortas (e algumas vivas), respectivamente.

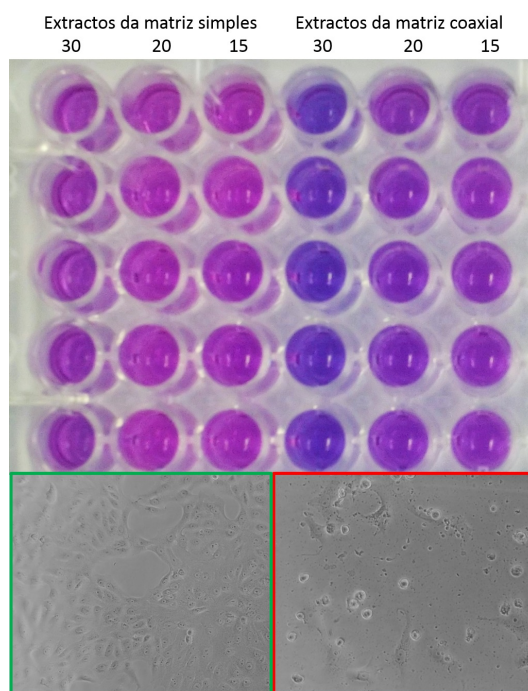


Figura 3.24: Viabilidade celular da sementeira após 48 horas de incubação com meios condicionados correspondentes a diferentes concentrações mg/mL. As imagens representam os resultados colorimétricos com recurso à resazurina, e das células semeadas num poço com concentrações de 30 mg/mL de matriz simples (verde) e coaxial (vermelho).

### 3.4.4 Ensaio com $\text{AgNO}_3$

O efeito das várias concentrações do sal que estiveram em contacto com diferentes densidades de células (4k e 8k células/mL) e durante diferentes tempos está representado na figura 3.25A. Como a absorvância é proporcional à actividade metabólica, verifica-se que para as concentrações até 1,5  $\mu\text{g/mL}$  as células estão vivas, não revelando que o sal produza efeitos citotóxicos nestas concentrações. Comparando os gráficos correspondentes à sementeira de 4k células, observa-se que a proliferação das células foi maior no primeiro período de 24 horas de contacto com o sal do que no segundo período de 24 horas. No entanto, tal não tem a haver com efeitos citotóxicos mas com o facto das células estarem a atingir a confluência. Todas as condições testadas, independentemente do tempo de contacto, mostram que a partir de 2  $\mu\text{g/mL}$ , o  $\text{AgNO}_3$  torna-se fatal. O mesmo se verifica no controlo positivo (CC+), onde não há actividade metabólica. O controlo negativo corresponde à concentração 0  $\mu\text{g/mL}$ .

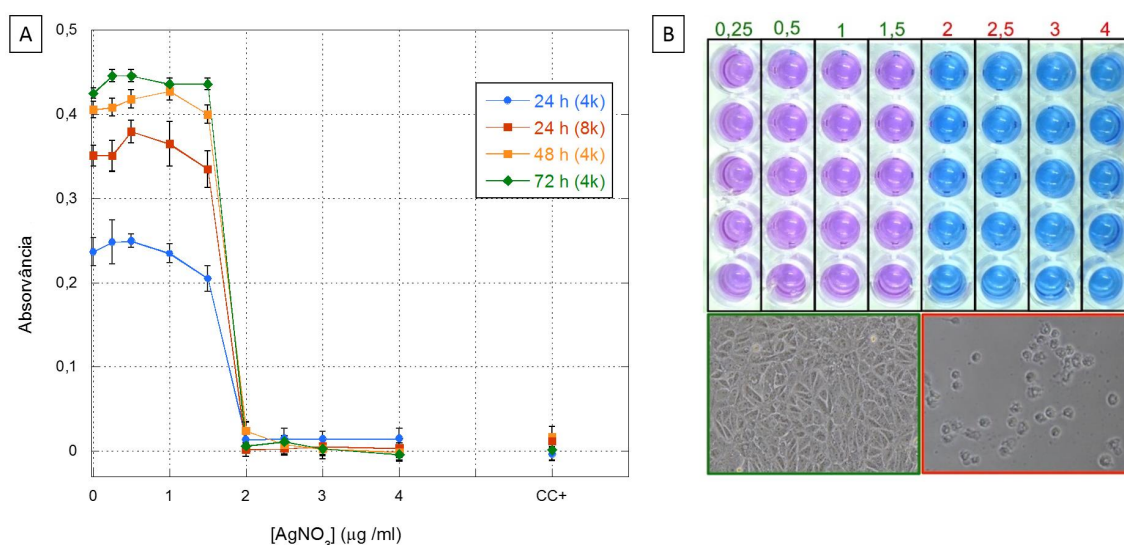


Figura 3.25: A) Representação gráfica da absorvância como medida da actividade celular, em função da concentração de  $\text{AgNO}_3$  no meio de cultura, para diferentes tempos de contacto das células com o meio. CC+ corresponde ao controlo positivo, e a concentração nula ao controlo negativo. B) Viabilidade celular da sementeira de 4k células após 72 horas de incubação com meios condicionados correspondentes a diferentes concentrações  $\mu\text{g/mL}$ . As imagens representam os resultados colorimétricos com recurso à resazurina, e das células semeadas num poço com uma concentração de 1.5 (verde) e 2  $\mu\text{g/mL}$  (vermelho).

A alteração da cor na placa de poços, figura 3.25B, foi observada na transição das concentrações de 1,5 para 2  $\mu\text{g/mL}$  (sementeira de 4k células com um acondicionamento de 72 horas), tal como no gráfico 3.25A, como se pode verificar na figura, onde também estão representadas figuras de um poço com células vivas e outro com células mortas, para as respectivas concentrações.

Desta forma, pode-se estabelecer que entre as concentrações 1,5 e as 2  $\mu\text{g/mL}$  o sal se torna tóxico para as células. Com estes resultados também se confirma que as nanopartículas têm um efeito citotóxico menor do que o do sal, uma vez que é necessária uma razão de m/V muito superior à do sal para provocar a morte celular.

## Capítulo 4

# Conclusões e perspectivas futuras

A presente dissertação tinha como objectivo principal estipulado a produção por electrofiação de nanofibras poliméricas com nanopartículas de prata e avaliação da sua actividade citotóxica. Foram produzidas nanofibras poliméricas com AgNPs usando duas técnicas diferentes: electrofiação simples e electrofiação coaxial. As fibras resultantes são morfologicamente diferentes mas com a mesma composição polimérica e de prata.

A produção das AgNPs foi realizada por irradiação por ultravioleta da solução de PVP a 15% m/m em DMF (solvente escolhido por também ser solvente do PCL) com uma razão PVP:AgNO<sub>3</sub>=100:1 (PVP15\_100), durante um total de 240 minutos. O processo utilizado tende a estabilizar, presumivelmente devido a quase toda a prata ter sido reduzida e estar sob a forma de agregados estáveis. Esta solução irradiada apresenta uma banda de SPR com um máximo associado aos 420 nm. As AgNPs produzidas têm uma forma esférica e possuem um diâmetro médio de  $13,0 \pm 0,5$  nm.

Através da electrofiação simples, usando uma solução composta pela mistura da solução PVP15\_100 com a solução de PCL a 10% m/m em clorofórmio, numa razão 1:3 m/m respectivamente, produziram-se nanofibras uniformes com AgNPs incorporadas.

A electrofiação coaxial tinha como finalidade a produção de fibras com duas camadas distintas alinhadas no mesmo eixo (coaxiais): a interna com as AgNPs (PVP15\_100), e a externa com PCL (PCL12\_DMF2\_Clorof8). No entanto este objectivo não foi cumprido na sua totalidade, porque não se conseguiu obter nanofibras somente coaxiais. Em primeiro lugar, o processo não foi consolidado, uma vez que nunca se conseguiu atingir a estabilidade com as soluções em jogo. Usando uma solução interna sem prata, PVP15, a estabilidade foi facilmente alcançada. Todavia, a solução com prata, de condutividade elevada, comprometeu o processo, tornando-o instável. Dado este problema e acrescentando a extrema sensibilidade do injector coaxial montado (pois os capilares do injector facilmente se desalinham), todo o processo se tornou dificultoso. Deste modo, as fibras produzidas foram analisadas por TEM, e observou-se que tanto existem fibras coaxiais, onde as AgNPs estão distribuídas longitudinalmente ao longo da fibra, assim como outras estão totalmente dispersas pela fibra. Neste processo definiu-se uma razão entre os caudais a usar de forma a garantir que a composição das matrizes produzidas por processos distintos é idêntica (matriz com uma razão PVP:PCL=1:2 e polímero:AgNO<sub>3</sub>=300:1).

As nanofibras coaxiais incorporam AgNPs de diâmetros com um valor médio de  $11,8 \pm 0,6$  nm, enquanto que as simples registaram  $11,4 \pm 1,0$  nm. Estes dados indicam que as partículas têm dimensões semelhantes, tanto as encapsuladas em fibras produzidas por ES e EC como em solução.

Nos ensaios de libertação, verificou-se que as nanofibras simples possibilitam uma libertação rápida



e controlada, registando uma intensidade máxima de absorvância de 0,65 aos 405 nm. Ao invés, as nanofibras coaxiais libertam as partículas ainda mais depressa, registando um máximo de 1,9 entre os 405 e 410 nm. Estes resultados indicam que apenas as AgNPs de diâmetros inferiores são capazes de se libertar.

Nos testes de citotoxicidade, as fibras simples revelam-se não citotóxicas, mostrando somente uma citotoxicidade ligeira a partir das 72 horas por contacto indirecto para uma razão m/V máxima de 30 mg/mL. Para razões inferiores não apresenta efeitos citotóxicos. Pelo contrário, as fibras coaxiais demonstraram uma citotoxicidade ligeira às 24 horas e evidenciaram-se fatais a partir das 48 horas, para a razão máxima m/V. Para 20 mg/mL tornam-se ligeiramente citotóxicas após 72 horas de contacto indirecto, enquanto que para razões inferiores não se registou qualquer efeito citotóxico. Este resultado das nanofibras coaxiais deve-se ao facto destas apresentarem uma maior concentração de partículas libertadas que, por conseguinte, aumenta a citotoxicidade.

Analizando a citotoxicidade do próprio sal, verificou-se que para concentrações iguais ou superiores a 2 µg/mL este é fatal para as células. Concentrações menores não revelam qualquer efeito, uma vez que as células são capazes de se proliferar ao longo do tempo.

Estes resultados revelam que o sal tem um efeito citotóxico superior ao das nanopartículas. Estas, por sua vez, podem revelar-se citotóxicas com o aumento do tempo de exposição, assim como com uma maior quantidade de AgNPs (maior dose).

De forma a complementar este estudo e para comprovar a eficácia das AgNPs no combate de infeções, é fulcral a realização de testes microbiológicos em diferentes estirpes de bactérias.

Finalmente, e como um dos objectivos implícitos não foi cumprido, é fundamental que, em primeiro lugar, se consiga montar um injector coaxial menos sensível, e posteriormente estabilizar o processo de electrofiação coaxial. Também seria interessante estudar as alterações sofridas pelas AgNPs devido à interação com as proteínas do meio de cultura.

Esta dissertação está inserida num estudo que visa a integração de AgNPs na componente epidérmica de um substituto temporário da pele, daí que todos estes resultados têm valor científico e importância no futuro da Engenharia de Tecidos.



# Bibliografia

- [1] S. Eckhardt, P. S. Brunetto, J. Gagnon, M. Priebe, B. Giese, and K. M. Fromm, “Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine.,” *Chemical reviews*, vol. 113, pp. 4708–54, July 2013.
- [2] Z.-m. Huang, Y. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, “A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites,” *Composites Science and Technology*, vol. 63, pp. 2223–2253, 2003.
- [3] H. Kong and J. Jang, “Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles.,” *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 24, pp. 2051–6, Mar. 2008.
- [4] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramírez, and M. J. Yacaman, “The bactericidal effect of silver nanoparticles.,” *Nanotechnology*, vol. 16, pp. 2346–53, Oct. 2005.
- [5] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.,” *Biotechnology advances*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, 2009.
- [6] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J.-H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C.-Y. Hwang, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, D. H. Jeong, and M.-H. Cho, “Antimicrobial effects of silver nanoparticles.,” *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, vol. 3, pp. 95–101, Mar. 2007.
- [7] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, and J. O. Kim, “A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus,” *John Wiley & Sons. Inc*, pp. 662–668, 2000.
- [8] M. Yamanaka, K. Hara, and J. Kudo, “Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on Escherichia coli , Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on Escherichia coli , Studied by Energy-Filtering Transmi,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 11, pp. 7589–7593, 2005.
- [9] I. Sondi and B. Salopek-Sondi, “Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria.,” *Journal of colloid and interface science*, vol. 275, pp. 177–82, July 2004.
- [10] S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, “Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli.,” *Applied and environmental microbiology*, vol. 73, pp. 1712–20, Mar. 2007.

- [11] A. Panacek, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizúrova, V. K. Sharma, T. Nevecna, and R. Zboril, "Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity.," *The journal of physical chemistry. B*, vol. 110, pp. 16248–53, Aug. 2006.
- [12] A. S. Kazachenko, A. V. Leagler, O. V. Per'yanova, and Y. A. Vstavskaya, "Synthesis and antimicrobial activity of silver complexes with histine and tryptophan," *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 34, no. 5, pp. 257–258, 2000.
- [13] D. J. Leaper, "Silver dressings: their role in wound management.," *International wound journal*, vol. 3, pp. 282–94, Dec. 2006.
- [14] M. P. Vinardell, "In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germ-Line Stem Cell," *Toxicological Sciences*, vol. 88, pp. 285–286, Dec. 2005.
- [15] C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D. S. Sutherland, and H. Autrup, "Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion?," *Toxicology letters*, vol. 208, pp. 286–92, Feb. 2012.
- [16] R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, D. A. Dang, H. J. Hoffmann, and H. Autrup, "PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes.," *Toxicology letters*, vol. 190, pp. 156–62, Oct. 2009.
- [17] S. M. Hussain, K. L. Hess, J. M. Gearhart, K. T. Geiss, and J. J. Schlager, "In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 19, pp. 975–983, 2005.
- [18] R. Rosa, *Incorporação de nanopartículas de prata em matrizes de nanofibras de polivinilpirrolidona e avaliação do seu potencial antibacteriano*. PhD thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [19] R. M. Pirzgalska, "Silver nanoparticles - loaded polymeric nanofibers: production, characterization and cytocompatibility," tech. rep., Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, MIT Portugal, 2012.
- [20] A. C. M. Nozaki, R. F. C. Marques, I. M. A. Diniz, M. M. Marques, and J. Marchi, "Cytotoxicity evaluation of collagen membranes aiming the application as a biomaterial," *7 Congresso Latino Americano de órgãos Artificiais e Biomateriais*, pp. REF 01–213, 2012.
- [21] M. Andrade, *Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultraestruturais de microcistinas em células Vero*. PhD thesis, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2007.
- [22] G. Fotakis and J. a. Timbrell, "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride.," *Toxicology letters*, vol. 160, pp. 171–7, Jan. 2006.
- [23] E. Saion, E. Gharibshahi, and K. Naghavi, "Size-controlled and optical properties of monodispersed silver nanoparticles synthesized by the radiolytic reduction method.," *International journal of molecular sciences*, vol. 14, pp. 7880–96, Jan. 2013.
- [24] H. Wang, X. Qiao, J. Chen, and S. Ding, "Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 256, pp. 111–115, Apr. 2005.
- [25] H. Wang, X. Qiao, J. Chen, X. Wang, and S. Ding, "Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 94, pp. 449–453, Dec. 2005.

- 
- [26] P. Sarkar, C. Parameswaran, C. Harish, M. B. Chandra, and a. N. Grace, "Kinetics of silver nanoparticle growth using DMF as reductant - Effect of surfactants," *Advanced Materials Research*, vol. 938, pp. 30–35, June 2014.
- [27] I. Pastoriza-Santos and L. M. Liz-Marzán, "Reduction of silver nanoparticles in DMF . Formation of monolayers and stable colloids," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 72, pp. 83–90, 2000.
- [28] B. Yin, H. Ma, S. Wang, and S. Chen, "Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles under Protection of Poly ( N -vinylpyrrolidone )," *The journal of physical chemistry. B*, vol. 107, pp. 8898–8904, 2003.
- [29] A. Kumar, H. Joshi, R. Pasricha, a. B. Mandale, and M. Sastry, "Phase transfer of silver nanoparticles from aqueous to organic solutions using fatty amine molecules.," *Journal of colloid and interface science*, vol. 264, pp. 396–401, Aug. 2003.
- [30] L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. García-Ramos, and G. Morcillo, "Growth of Silver Colloidal Particles Obtained by Citrate Reduction To Increase the Raman Enhancement Factor," *Langmuir*, vol. 17, no. 11, pp. 574–577, 2001.
- [31] P. Y. Silvert, P. Vibert, R. Herrera-Urbina, and K. T. Elhsissen, "Synthesis and characterization of nanoscale Ag-Pd alloy particles," *NanoStructured Materials*, vol. 7, pp. 611–618, 1996.
- [32] Y. Sun and Y. Xia, "Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 298, pp. 2176–9, Dec. 2002.
- [33] M. Starowicz, B. Stypula, and J. Banaś, "Electrochemical synthesis of silver nanoparticles," *Electrochemistry Communications*, vol. 8, pp. 227–230, Feb. 2006.
- [34] L. Rodríguez-Sánchez, M. C. Blanco, and M. A. López-Quintela, "Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles," *Journal of periodontal research*, vol. 104, pp. 9683–9688, 2000.
- [35] S. Kéki, J. Török, G. Deák, L. Daróczi, and M. Zsuga, "Silver Nanoparticles by PAMAM-Assisted Photochemical Reduction of Ag(+).," *Journal of colloid and interface science*, vol. 229, pp. 550–553, Sept. 2000.
- [36] K. Mallick, M. J. Witcomb, and M. S. Scurrall, "Self-assembly of silver nanoparticles in a polymer solvent: formation of a nanochain through nanoscale soldering," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 90, pp. 221–224, Apr. 2005.
- [37] H. H. Huang, X. P. Ni, G. L. Loy, C. H. Chew, K. L. Tan, F. C. Loh, J. F. Deng, and G. Q. Xu, "Photochemical Formation of Silver Nanoparticles in Poly ( N -vinylpyrrolidone )," *Langmuir*, vol. 12, no. 12, pp. 909–912, 1996.
- [38] L. Marette, P. S. Billone, Y. Liu, and J. C. Scaiano, "Facile photochemical synthesis and characterization of highly fluorescent silver nanoparticles.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, pp. 13972–80, Oct. 2009.
- [39] A. Pal, S. Shah, and S. Devi, "Synthesis of Au, Ag and Au-Ag alloy nanoparticles in aqueous polymer solution," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 302, pp. 51–57, July 2007.
- [40] V. R. Chaudhari, S. K. Haram, S. Kulshreshtha, J. Bellare, and P. Hassan, "Micelle assisted morphological evolution of silver nanoparticles," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 301, pp. 475–480, July 2007.

- [41] Y. Zhou, S. H. Yu, C. Y. Wang, X. G. Li, Y. R. Zhu, and Z. Y. Chen, "A Novel Ultraviolet Irradiation Photoreduction Technique for the Preparation of Single-Crystal Ag Nanorods and Ag Dendrites," *Advanced Materials*, vol. 11, pp. 850–852, July 1999.
- [42] P. K. Sudeep and P. V. Kamat, "Photosensitized Growth of Silver Nanoparticles under Visible Light Irradiation : A Mechanistic Investigation," *Chemistry of Materials*, vol. 17, no. 33, pp. 5404–5410, 2005.
- [43] W. Tu and H. Liu, "Continuous Synthesis of Colloidal Metal Nanoclusters by Microwave Irradiation," *Chemistry of Materials*, vol. 12, pp. 564–567, 2000.
- [44] P. Vasileva, B. Donkova, I. Karadjova, and C. Dushkin, "Synthesis of starch-stabilized silver nanoparticles and their application as a surface plasmon resonance-based sensor of hydrogen peroxide," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 382, pp. 203–210, June 2011.
- [45] Y. Rao, D. Banerjee, A. Datta, S. Das, R. Guin, and A. Saha, "Gamma irradiation route to synthesis of highly re-dispersible natural polymer capped silver nanoparticles," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 79, pp. 1240–1246, Dec. 2010.
- [46] C. H. Bae, S. H. Nam, and S. M. Park, "Formation of silver nanoparticles by laser ablation of a silver target in NaCl solution," *Applied Surface Science*, vol. 197-198, pp. 628–634, Sept. 2002.
- [47] F. Mafune, J.-y. Kohno, Y. Takeda, and T. Kondow, "Structure and Stability of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution Produced by Laser," *The journal of physical chemistry. B*, vol. 104, no. 35, pp. 0–4, 2000.
- [48] A. B. Smetana, K. J. Klabunde, and C. M. Sorensen, "Synthesis of spherical silver nanoparticles by digestive ripening, stabilization with various agents, and their 3-D and 2-D superlattice formation," *Journal of colloid and interface science*, vol. 284, pp. 521–6, Apr. 2005.
- [49] A. K. Moghe and B. S. Gupta, "Coaxial Electrospinning for Nanofiber Structures: Preparation and Applications," *Polymer Reviews*, vol. 48, pp. 353–377, May 2008.
- [50] B. J. H. Yu, S. V. Fridrikh, and G. C. Rutledge, "Production of Submicrometer Diameter Fibers by Two-Fluid Electrospinning," *Advanced Materials*, vol. 16, no. 17, pp. 1562–1566, 2004.
- [51] H. Jiang, Y. Hu, Y. Li, P. Zhao, K. Zhu, and W. Chen, "A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents," *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 108, pp. 237–43, Nov. 2005.
- [52] Z.-M. Huang, C.-L. He, A. Yang, Y. Zhang, X.-J. Han, J. Yin, and Q. Wu, "Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning," *Journal of biomedical materials research. Part A*, vol. 77, pp. 169–79, Apr. 2006.
- [53] X. Qin and D. Wu, "Effect of different solvents on poly(caprolactone) (PCL) electrospun nonwoven membranes," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 107, pp. 1007–1013, May 2011.
- [54] M. Labet and W. Thielemans, "Synthesis of polycaprolactone: a review.," *Chemical Society reviews*, vol. 38, pp. 3484–504, Dec. 2009.

- 
- [55] “<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440752?lang=ptregion=pt>,” Janeiro 2015.
  - [56] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, “Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review.,” *Tissue engineering*, vol. 12, no. 5, pp. 1197–1211, 2006.
  - [57] J. Martins, *Membranas Compósitas de Policaprolactona/ Hidroxipatite para Aplicação Estomatológica*, year = 2011. PhD thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa.
  - [58] S. Ramakrishna, *An introduction to Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific Publishing, 2 ed., 2005. pages: 90-116.
  - [59] A. Rebelo, *Produção de Espumas 3D Porosas por Auto-Organização de Nanofibras de Policaprolactona*, year = 2014. PhD thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa.
  - [60] Y. Zhang, Z.-m. Huang, X. Xu, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, “Preparation of Core - Shell Structured PCL-r-Gelatin Bi-Component Nanofibers by Coaxial Electrospinning,” *Chemistry of Materials*, vol. 12, pp. 3406–3409, 2004.
  - [61] Z. Sun, E. Zussman, A. Yarin, J. Wendorff, and A. Greiner, “Compound Core-Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning,” *Advanced Materials*, vol. 15, pp. 1929–1932, Nov. 2003.
  - [62] D. Li and Y. Xia, “Direct Fabrication of Composite and Ceramic Hollow Nanofibers by Electrospinning,” *Nano Letters*, vol. 4, pp. 933–938, May 2004.
  - [63] “[http://www.tedpella.com/support\\_films.html](http://www.tedpella.com/support_films.html),” Março 2015.
  - [64] “<http://nanocomposix.com/pages/plasmonics-and-nanophotonics>,” Março 2015.
  - [65] K. H. Lee, H. Y. Kim, M. S. Khil, Y. M. Ra, and D. R. Lee, “Characterization of nano-structured poly( $\epsilon$ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning,” *Polymer*, vol. 44, no. 4, pp. 1287–1294, 2003.
  - [66] C.-M. Hsu and S. Shivkumar, “N,N-Dimethylformamide Additions to the Solution for the Electrospinning of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanofibers,” *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 289, pp. 334–340, Apr. 2004.
  - [67] C. Guo, L. Zhou, and J. Lv, “Effects of expandable graphite and modified ammonium polyphosphate on the flame-retardant and mechanical properties of wood flour-polypropylene composites,” *Polymers and Polymer Composites*, vol. 21, no. 7, pp. 449–456, 2013.
  - [68] P. Humpolicek, V. Kasparkova, P. Saha, and J. Stejskal, “Biocompatibility of polyaniline,” *Synthetic Metals*, vol. 162, no. 7-8, pp. 722–727, 2012.
  - [69] V. Banerjee and K. P. Das, “Interaction of silver nanoparticles with proteins: A characteristic protein concentration dependent profile of SPR signal,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 111, pp. 71–79, 2013.
  - [70] S. Kittler, C. Greulich, J. S. Gebauer, J. Diendorf, L. Treuel, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Zellner, M. Köller, and M. Epple, “The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles,” *Journal of Materials Chemistry*, vol. 20, no. 3, p. 512, 2010.

- [71] R. Liu, F. Sun, L. Zhang, W. Zong, X. Zhao, L. Wang, R. Wu, and X. Hao, “Evaluation on the toxicity of nanoAg to bovine serum albumin.,” *The Science of the total environment*, vol. 407, no. 13, pp. 4184–4188, 2009.

## Apêndice A

# Teste de Citotoxicidade

### A.1 Cultura celular

1. Observou-se a cultura de células *Vero* (células epiteliais do rim do macaco verde africano) no T25 no microscópio invertido (Nikon Eclipse Ti-S), de forma a analisar a sua confluência e confirmar a ausência de contaminação microbiana e fúngica.
2. Removeu-se o meio de cultura com uma pipeta de *pasteur*, sem tocar na camada de células.
3. Lavou-se a camada de células com PBS<sup>---</sup> (sem cálcio nem magnésio) e voltou-se a aspirar. O processo deve ser repetido quando as células estão fortemente aderidas ao substrato.
4. Pipetou-se 500 $\mu$ L de tripsina previamente aquecida, de forma a cobrir todas as células para que estas se soltem. Agitou-se ligeiramente o frasco de cultura T25 (25 cm<sup>2</sup> de área) para espalhar a tripsina por todas as células.
5. Colocou-se o T25 na incubadora a 37°C (5% CO<sub>2</sub>, SANYO CO<sub>2</sub> incubator, Model HCO-19AIC (UV)) durante 5 minutos.
6. Diluiu-se a tripsina com 2 mL de meio de cultura, previamente aquecido a 37°C em banho de água (Mermmet). Transferiu-se a suspensão celular para um *falcon*. Retirou-se 100 $\mu$ L e efectuou-se a contagem de células.
7. Semearam-se as células numa placa de 96 poços de acordo com a densidade celular pretendida.
8. Colocou-se a placa de poços na incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

#### A.1.1 Contagem de células

Para realizar a contagem utilizou-se o azul de tripano, corante que permite distinguir as células viáveis das inviáveis. Quando a célula morre, a sua membrana rompe-se possibilitando a entrada do corante para o seu interior, ganhando um tom azul. Pelo contrário, uma célula viva impede a entrada do corante dada a integridade da sua membrana.

O método de contagem das células adoptado seguiu o seguinte procedimento:

1. Retirou-se 100 $\mu$ L da suspensão de células para um microtubo.

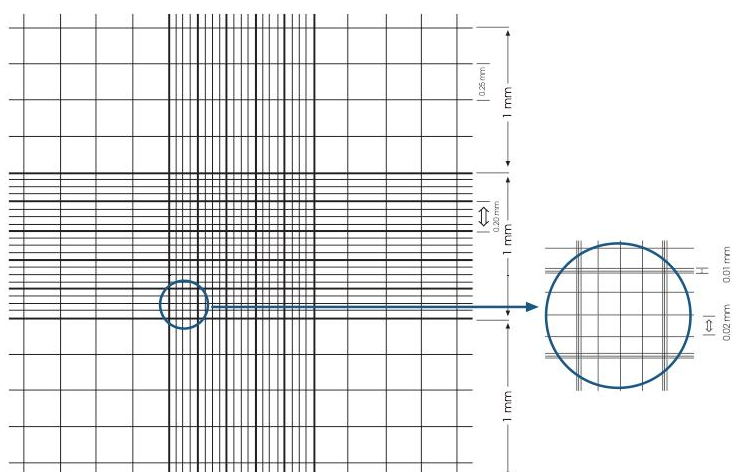


Figura A.1: Esquema de contagem do hemocitômetro, com câmaras de 1 mm de espessura.

2. Adicionou-se igual quantidade de azul de tripano (factor de diluição 2) e misturou-se.
3. Limpou-se o hemocitômetro, figura A.1. Humedeceu-se a lamela e posteriormente colocada sobre o hemocitômetro.
4. Encheram-se as duas câmaras de contagem do hemocitômetro com a suspensão celular, e foram observadas no microscópio invertido com contraste de fase usando uma ampliação de 10x ou 20x.
5. Contou-se o número de células viáveis (pequenas esferas brilhantes). Anotou-se o número de quadrados para obter a contagem de células.
6. Calculou-se a concentração de células viáveis de acordo com a equação A.1. O factor de 10 000 resulta da conversão do volume da câmara de contagem ( $0.1 \text{ mm}^3$ ) em mL.

(A.1)

## A.2 Teste de extracto por método indirecto (Teste de citotoxicidade)

1. O meio condicionado (meio de extracto) foi previamente preparado, colocando uma massa de matriz num volume de meio de cultura de forma a prefazer a razão máxima, e foi adicionado 1% de antifúngico V/V (*fungizone*).
2. Depois de preparado, o meio de extracto foi colocado na incubadora durante 24h a  $37^\circ\text{C}$  e em agitação (J.P. Selecta, s.a.).
3. No dia seguinte, foram realizadas sucessivas diluições a partir desta razão máxima, adicionando o volume necessário de meio de cultura. Cada diluição foi bem ressuspensa.
4. Um dia depois da sementeira, o meio de cultura foi removido e substituído por meio condicionado.



5. As células ficaram expostas ao meio condicionado durante 24 horas. No caso dos ensaios III e IV as células estiveram em contacto com o meio de extracto durante 24, 48 e 72 horas.
6. No controlo negativo o meio de cultura foi substituído por novo meio de cultura.
7. No controlo positivo, o meio de cultura foi substituído por novo meio mais  $20\mu\text{L}$  de DMSO (dimetilsulfóxido).
8. No dia seguinte, aspirou-se o meio condicionado de todos os poços e adicionou-se meio de cultura com 10% V/V de resazurina.
9. Os controlos também foram substituídos por meio de cultura com resazurina, assim como se estabeleceu o controlo de meio com esta mistura (poços sem células).
10. A placa de poços foi colocada na incubadora.
11. Cerca de 2h depois, realizou-se a análise espectrofotométrica da placa para os comprimentos de onda de 570 e 600 nm.
12. A partir destas leituras de absorvância, determinou-se a viabilidade celular.

### A.3 Teste de citotoxicidade do $\text{AgNO}_3$

1. Preparou-se uma solução inicial de  $\text{AgNO}_3$  com uma concentração de 20 mg/mL em água ultra-pura estéril.
2. Esta solução foi diluída consecutivamente primeiro 50 vezes e depois 100 vezes com meio de cultura de modo a obter concentrações de  $400\mu\text{g/mL}$  e  $4\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.
3. A partir da solução de  $4\mu\text{g/mL}$  foram obtidas por diluição com meio de cultura as concentrações de 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 e  $0.25\mu\text{g/mL}$ .
4. As soluções com as concentrações de 4 a  $0.25\mu\text{g/mL}$  correspondem aos meios condicionados.
5. Prepararam-se várias sementeiras: três com uma densidade celular de 4k células por poço e apenas uma com 8k células por poço.
6. Passadas 24h da incubação das sementeiras, os meios de cultura foram substituídos por meio condicionado.
7. No controlo negativo o meio de cultura foi substituído por novo meio de cultura.
8. No controlo positivo, o meio de cultura foi substituído por novo meio mais  $20\mu\text{L}$  de DMSO (dimetilsulfóxido).
9. As sementeiras com 4k foram analisadas para três tempos: 24, 48 e 72 horas.
10. A sementeira com 8k foi analisada para as 24 horas de contacto.
11. Após cada tempo de contacto ter sido atingido, aspirou-se o meio condicionado de todos os poços e adicionou-se meio de cultura com 10% V/V de resazurina.
12. Os controlos também foram substituídos por meio de cultura com resazurina, assim como se estabeleceu o controlo de meio com esta mistura (poços sem células).

13. Cerca de 2h depois da incubação, realizou-se a análise espectrofotométrica da placa para os comprimentos de onda de 570 e 600 nm.
14. A partir destas leituras de absorvância, determinou-se a viabilidade celular.